HETEROLOGE SCHUTZIMPFUNG GEGEN DIE STOMATITIS PAPULOSA MIT EINEM ORF-LEBENDIMPFSTOFF

Mathias Büttner

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0047

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h. c. A. Mayr

HETEROLOGE SCHUTZIMPFUNG GEGEN DIE STOMATITIS PAPULOSA MIT EINEM ORF-LEBENDIMPFSTOFF

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Mathias Büttner
aus
Mittenwald

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 27. Februar 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS SEITE

1. EINLEITUNG 1

2. SCHRIFTTUM ÜBER AKTIVE SCHUTZIMPFUNG MIT HETEROLOGEN IMPFSTOFFEN 3

2.1. Begriffsbestimmung 3

2.2. Vor- und Nachteile heterologer Impfstoffe 8

2.3. Unterschiedliche Wirkungsmechanismen bei heterologen Impfstoffen 13

2.4. Bisher in der Praxis bewährte heterologe Impfstoffe 16

2.4.1. Gegen Viruskrankheiten 16

2.4.2. Gegen bakterielle Krankheiten 25

2.5. Neu entwickelte heterologe Impfstoffe 27

2.5.1. Gegen Viruskrankheiten 27

2.5.2. Gegen bakterielle Krankheiten 31

2.6. Mögliche Entwicklung neuer heterologer Impfstoffe 32

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 42

3.1. Material und Methoden 42

3.1.1. Tiermaterial 42

3.1.2. Impfstoff 44

3.1.3. Impfmodus 48

3.1.4. Untersuchungen über die Unschädlichkeit und Wirksamkeit des Impfstoffes 49

3.1.4.1. Unschädlichkeitsprüfungen 49

3.1.4.2. Wirksamkeitsprüfungen 50

Antikörperbildung 50

Hauttest 54

3.1.4.3. Infektionsbelastungsversuch und immunsuppressive Behandlung 58

3.2. Ergebnisse 59

3.2.1. Unschädlichkeit 59

3.2.2. Wirksamkeit 60

3.2.2.1. Bildung humoraler Antikörper 60
3.2.2.2. Nachweis zellulärer Immunreaktionen 64
3.2.3. Infektionsbelastungsversuch 68

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 71

5. ZUSAMMENFASSUNG 76

SUMMARY 78

6. LITERATURVERZEICHNIS 80

LEBENSLAUF 92

1. EINLEITUNG

Daß die Abgrenzung der Virusarten innerhalb des Genus "Parapoxviridae" bis heute Schwierigkeiten macht, liegt in erster Linie an der engen serologischen Verwandtschaft (54) und dem weitgehend gleichen Zell- und Wirtsspektrum der drei klassifizierten Vertreter Parapoxvirus ovis, -bovis 1 und -bovis 2 (62). Neueste Neutralisationskinetische Studien und Restriktionsanalysen mit bewährten Endonukleasen an den DNAs von verschiedenen Isolaten zeigen eine ausgeprägte serologische Kreuzreaktion zwischen allen Stämmen, wogegen die "Schnittbilder" der einzelnen DNAs nicht übereinstimmen. Bei den Vertretern von Parapoxvirus bovis weisen sie allerdings erheblich mehr Gemeinsamkeit auf als bei denen von Parapoxvirus ovis und vom Menschen stammenden Isolaten. Ein deutlicher Unterschied besteht in der Restriktionsanalyse zwischen der DNA von Stämmen der Parapoxvirus ovis-Art (ORF-Virus) und der Parapoxvirus bovis-Art (Stomatitis Papulosa SP-Erreger)(102). Neben dieser genetischen Verschiedenartigkeit lassen jedoch die serologischen Kreuzreaktionen den Schluß auf eine größere Anzahl gemeinsamer Antigene zu. Dies veranlaßte uns, eine heterologe Immunisierung von Rindern gegen die Stomatitis papulosa bovis mit einem auf der Basis des Zellkulturadaptierten Stammes D 1701 entwickelten ORF-Lebendimpfstoffes durchzuführen.

Die Stomatitis Papulosa bovis ist eine meist gutartig verlaufende kontagiöse Erkrankung vor allem der Jungtiere, die durch typische lokalisierte, papulöse Exantheme auf der Schleimhaut von Gaumen, Zunge und Lippen, gelegentlich auch am Flotzmaul und auf der kutanen Schleimhaut des Pansens und des Oesophagus charakterisiert ist. Früher wurde das klinische Bild fälschlicherweise mit Hyperkeratose verursachendem Futter und mit der Chlornaphthalin-Vergiftung in Verbindung gebracht, auch war die Unterscheidung vom Mucosal-Disease-Virusdiarrhoe-Komplex, der MKS und des BKF ohne Erregerisolation nicht

einfach. Damals (Diekerhoff 1903) existierte der Sammelbegriff "Sporadische Aphtenseuche" für alle Stomatitiden, ausgenommen der bereits gut bekannten MKS und der Rinderpest (23).
Vor dem Hintergrund der heutigen Massentierhaltung (Crowding Disease)und der Zunahme streßbedingter Immunsuppression, ist die Krankheit, offenbar als Ausdruck vorübergehender Resistenzminderung, wieder verstärkt in Erscheinung getreten (67). Betroffen sind vor allem Jungrinder, die aus den verschiedensten Beständen, zum Teil auch aus dem Ausland zur Mast angekauft werden.
Der verwendete Impfstoff ist bereits mit Erfolg zur Prophylaxe und als Notimpfstoff gegen den ansteckenden Lippengrind (Ekthyma contagiosum) der Schafe als unschädliche homologe ORF-Vaccine subcutan verwendet worden (108). Diese durch das Parapoxvirus ovis (ORF) verursachte Schafkrankheit unterscheidet sich von der Stomatitis Papulosa bovis durch - neuerdings gehäuft auftretende - bösartige Erscheinungsbilder mit blumenkohlartigen Wucherungen bei der labialen Form und einer relativ hohen Mortalität bei Sauglämmern(bis 20 %)(95).

2. SCHRIFTTUM ÜBER AKTIVE SCHUTZIMPFUNG MIT HETEROLOGEN IMPFSTOFFEN

2.1. Begriffsbestimmung

Unter Immunität versteht man die im Leben erworbene Widerstandskraft eines Organismus, die streng Erreger- bzw. Antigen-spezifisch ist (68). Durch eine aktive Schutzimpfung versucht man, künstlich den Organismus zur Bildung einer Immunität zu stimulieren. Zweck einer Schutzimpfung ist es, dem Impfling über eine mehr oder weniger lange Zeit einen spezifischen Schutz zu verleihen, entweder gegen den zur Krankheit führenden Verlauf einer ganz bestimmten Infektion oder gegen einen Schaden, der durch die betreffende Infektion für ihn oder für einen anderen z.B. den Embryo oder das Neugeborene entstehen kann. Dabei ist die Erreger- bzw. Toxinspezifität - allgemein die Antigenspezifität - Voraussetzung des Schutzes, der sich gegen die Vermehrung und Ausbreitung des Erregers, gegen die Wirkung der von ihm produzierten Schadstoffe oder gegen beide Vorgänge gleichzeitig richtet. Eine Schutzimpfung übertrifft die natürliche Immunisierung, die als ständige unkontrollierte Auseinandersetzung des Organismus mit seiner keimhaltigen Umwelt oder durch den Schutzstofftransfer von der Mutter über das Kollostrum bzw. intrauterin oder transovariell auf das Neugeborene bzw. den Foetus erfolgt, indem sie gezielt gegen pathogene Mikroben bzw. deren Auswirkungen eingesetzt wird.

Wie bei der natürlichen Immunisierung unterscheidet man entsprechend auch bei der Schutzimpfung zwischen einer aktiven und passiven Immunisierung. Für die aktive, künstliche Immunisierung verwendet man Impfstoffe oder Vaccinen.

Impfstoffe sind Arzneimittel, die Antigene enthalten und dazu bestimmt sind, bei Mensch oder Tier zur Erzeugung von spezifischen Abwehr- oder Schutzstoffen angewandt zu werden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung und Herstellung unterscheidet man Lebendimpfstoffe,

Impfstoffe aus inaktivierten Erregern, Spalt- oder subunit-Vaccinen und Toxoidimpfstoffe. Jede dieser vier Impfstoffarten kann entweder als homologer Impfstoff oder als heterologer Impfstoff eingesetzt werden. Ein homologer Impfstoff enthält immunisierende Antigene der Erregerspezies oder der Toxine, gegen die immunisiert werden soll, so enthält der Impfstoff zur aktiven Immunisierung gegen die Maul- und Klauenseuche inaktiviertes MKS-Virus unterschiedlicher Serotypen und der Impfstoff gegen Tetanus entgiftetes Tetanustoxin (Toxoid).
Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Erregerspezies und Toxinen, die weniger vom Genotyp, sondern vielmehr von der phänotypischen Ausprägung her bedeutsam sind(102), haben gemeinsame immunisierende Antigene zur Grundlage (Kreuzimmunität). Diese Antigenverwandtschaft kann verschieden stark ausgebildet sein und der Organismus reagiert entsprechend unterschiedlich stark auf diese "ähnlichen" Antigene. Damit ist die Möglichkeit gegeben bei entsprechend verwandten Erregern oder Toxinen kreuzweise gegen die durch sie erzeugten Krankheiten zu immunisieren, und zwar entweder in beiden Richtungen oder nur "eingleisig", wobei die zu immunisierende Tierart in der Regel den einen oder anderen Impferfolg bestimmt.
Im Falle einer aktiven Schutzimpfung bezeichnet man die entsprechenden Impfstoffe als heterolog (heterotypisch, heterospezifisch). Der Begriff "heterotypisch" ist im englischen Sprachgebrauch jedoch speziell im Zusammenhang mit Influenzavirusinfektionen üblich, wobei zwischen "heterotypic" und "heterologous" streng unterschieden werden muß.
Als heterotypischer Schutz - "heterotypic immunity" - wird das Phänomen bezeichnet, daß nach einer vorausgegangenen Influenza A-Infektion bzw. Schutzimpfung die durch eine nachfolgende Infektion (natürlich oder experimentell) mit einem anderen Influenza A-Subtyp (Stamm) verursachte Erkrankung wesentlich milder verläuft.

Das heißt, sie bleibt auf den oberen Respirationstrakt lokalisiert und eine Virausausscheidung wird verhindert bzw. eingeschränkt (106, 107). Yetter et al.geben der heterotypischen Influenzaimmunität das klinische Prädikat eines wesentlich milderen Krankheitsverlaufes und einer beschleunigten Genesung - "enhanced recovery"- (107). Im Gegensatz dazu steht die Schutzsituation nach einer sekundären Exposition mit einer völlig anderen Influenzavirus-Spezies, zum Beispiel mit Influenza B-Virus. Dies entspricht dem Vorgang einer heterologen Immunisierung. Hier versagt im Influenza-Schutzmodell bei Frettchen wegen zu starker Antigenunterschiede zwischen Influenzaviren A und B die heterologe Schutzwirkung. Eine prophylaktische Verhinderung der Erkrankung, wie bei der heterologen Schutzimpfung üblich, kann nicht erzielt werden.
Ein heterologer Impfstoff enthält immunisierende Antigene, die nicht von der Erregerspezies oder von den Toxinstämmen, gegen die immunisiert werden soll, sondern von anderen, aber antigenverwandten Erregerspezies bzw. Toxinen stammen. Die Wirksamkeit einer heterologen aktiven Schutzimpfung beruht auf dem gleichen Prinzip wie bei der homologen Impfung: Bildung sekretorischer und humoraler Antikörper, 2. Bildung von Immunzellen (Effektorzellen, Killerzellen, Helferzellen, Repressorzellen) und 3. Bildung von Memoryzellen. Je nach Impfstoffart und Reaktionslage des Impflings werden dabei alle drei Immunitätsmechanismen oder nur einige davon stimuliert. Immer aber bewirkt die Primärimpfung, daß der nun in Bezug auf ein Antigen erfahrene Organismus bei erneutem Kontakt mit dem homologen oder heterologen Erreger oder Toxin anders, d.h. mit explosionsartiger Neubildung von Antikörpern und Immunzellen (Boostereffekt, anamnestische Reaktion) reagiert, als der in Bezug auf dieses Antigen unerfahrene Organismus (immunologische Gedächtnisreaktion).
In der Tabelle 1 sind die Unterschiede und Wirkungsmechanismen homologer und heterologer Impfstoffe grob schematisch zusammengestellt.

Tabelle 1:

Unterschiede und Wirkungsmechanismen homologer und heterologer Impfstoffe

Art des Impfstoffes	Definition	Beabsichtigte Wirkung	Träger der Wirkung	Dauer bis Eintritt d. Schutzes	Boosterreaktion
HOMOLOGER Impfstoff	Enthält immunisierende Antigene der Erregerspezies oder der Toxine, gegen die immunisiert werden soll.	HOMOLOGE Immunität	1. Antikörper: (B-abhängig) IgM, IgA (sekretorisch u. humoral) IgG (humoral)	5 - 10 Tage	JA
HETEROLOGER Impfstoff	Enthält immunisierende Antigene, die nicht von der Erregerspezies oder von den Toxinen stammen, gegen die immunisiert werden soll, sondern von anderen, aber antigenverwandten Erregerspezies bzw. Toxinen	KREUZ-IMMUNITÄT	2. Immunzellen: (T-abhängig) Effektorzellen Killerzellen Helferzellen Repressorzellen 3. Memoryzellen: 4. Paraspez.Effekte		

Neben der hochspezialisierten immunologischen Gedächtnisreaktion eines künstlich sensibilisierten Organismus werden durch eine aktive Immunisierung Abwehrmechanismen Nicht-Erreger bzw. Nicht-Antigen spezifischer Art stimuliert. Diese schon von Jenner bezüglich der Wechselbeziehungen zwischen Herpes- und Pockenschutzimpfung erwähnten und von Robert Koch bei verschiedenen Schutzimpfungen mit bakteriellen Impfstoffen nachgewiesenen Hemmeffekte gegen andere Infektionserreger, werden nach Mayr mit dem Begriff "Paramunität" zusammengefaßt (68). Als Ursachen der paraspezifischen Wirkung aktiver homologer oder heterologer Schutzimpfungen konnten experimentell nachgewiesen werden:
1. Keimkonkurrenz und Antibiose, 2. heterologe Interferenz bei Viren, 3. Steigerung der Phagozytose, 4. Induktion der Interferonbildung, 5. Aktivierung des lymphopoetischen Zellsystems, 6. Stimulierung humoraler Faktoren und 7. Aktivierung lysosomaler Enzyme. Die Tatsache, daß sich ein Organismus über eine aktive Schutzimpfung, besonders wenn es sich um Lebendimpfstoffe handelt (Mehrzahl der heterologen Impfstoffe), einen Schutz gegenüber Nicht-Erreger-verwandten Infektionen erwerben kann, wird neuerdings mit der Entwicklung sogenannter Paramunitätsinducer verstärkt zur Infektabwehr ausgenutzt (69, 92). Der gravierendste Unterschied zur homologen bzw. heterologen Schutzimpfung liegt bei der Paramunisierung in der äußerst kurzen Schutzdauer (nur einige Tage) und dem Ausbleiben einer Boosterreaktion (94), die Möglichkeit einer gleichzeitigen Paramunisierung im Zusammenhang mit einer aktiven heterologen Schutzimpfung kann aber nur begrüßt werden.

2.2. Vor- und Nachteile heterologer Impfstoffe

Die zwei Hauptanforderungen an jeden Impfstoff, nämlich erstens nach Wirksamkeit und zweitens nach Unschädlichkeit, entscheiden letztlich über die Herstellung der einen oder anderen Vaccineart, wobei natürlich noch die jedem Seuchengeschehen eigenen immunologischen, epidemiologischen und pathologischen Gegebenheiten berücksichtigt werden müssen. Es ist für jeden Impfstoff charakteristisch, wie die Bedingung unschädlich und gleichzeitig wirksam zu sein, realisiert werden kann. Bei annähernd gleicher Wirksamkeit wird stets die Vaccineart bevorzugt werden, die die Forderung "primum non nocere" am vollständigsten erfüllt. Wie verhalten sich nun die heterologen Impfstoffe bezüglich dieser Wertmaßstäbe?

Als erstes fällt auf, daß es sich beim überwiegenden Teil der heterologen Impfstoffe um Lebendvaccinen handelt. Der Nachteil gegenüber Impfstoffen aus inaktivierten Erregern oder Subunit-Impfstoffen ist im risikoreicheren Einsatz zu sehen, weil sich 1. der Impfstamm im Impfling vermehren kann und ausgeschieden wird, 2. weil die Möglichkeit einer Persistenz in vom Tier stammenden Lebensmitteln gegeben ist, 3. weil erneute Virulenz auftreten kann und 4. weil Impferkrankungen und Embryopathien nicht ausgeschlossen werden können. Somit ist allgemein die Verwendung von Lebendimpfstoffen limitiert, und zwar, wenn kein anderer wirksamer Impfstoff zur Verfügung steht, in ubiquitär verseuchten Gebieten oder zur Notimpfung. Demgegenüber stehen folgende Vorteile von Lebendvaccinen: Ausbildung einer komplexen Immunität, paraspezifische Wirkungen (z.B. Interferon-Induktion, Steigerung der Phagozytose und anderes mehr), schnelle und langdauernde Immunität, keine Provokation bei Notimpfungen, billige Herstellung und einfache Anwendung in der Massentierhaltung, z.B. über das Trinkwasser. Dies alles gilt auch für heterologe Lebendimpfstoffe mit Ausnahme einer geringgradig verminderten Immuni-

tät (Kreuzimmunität). Die heterologen Vaccinen haben jedoch bedeutend weniger Nachteile: zunächst fehlt die Gefahr einer Rückwandlung zur Virulenz für den Impfling, Impferkrankungen und Embryopathien werden vermieden. Der Hauptvorteil liegt aber darin, daß es nach Einsatz heterologer Impfstoffe zu keinem "Leben mit dem Erreger" kommt. Der heterologe Impfstamm verdrängt den homologen Seuchenerreger und man kann dadurch auch in permanent verseuchten Ländern zum Status einer "Seuchenfreiheit" im Rahmen eines entsprechenden Eradikationsprogrammes kommen. Das klassische Beispiel ist die Ausrottung der Menschenpocken durch die weltweite Schutzimpfung der Bevölkerung mit dem für den Menschen heterologen, vermehrungsfähigen Vaccinia-Virus. Mit einem homologen Variola-Lebend-Impfstoff wäre dies nie gelungen. Die Möglichkeit der Tilgung weiterer gefährlicher, weltweit verbreiteter Seuchen zeigt das Vorbild der Pocken-Eradikation. Es wird deshalb auch zukünftig sinnvoll sein, neue heterologe Impfstoffe zu entwickeln. Bei der serologischen Diagnostik während der epidemiologischen Kontrolle eines Seuchengeschehens, aber auch bei sporadischen Erkrankungen einzelner Individuen, gibt es immer wieder Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zwischen postvaccinalen und postinfektiösen Antikörpern nach homologen Schutzimpfungen.

Die nach einer heterologen Schutzimpfung im Impfling gebildeten Antikörper lassen sich dagegen mit verfeinerten Methoden relativ gut gegenüber den nach einer natürlichen Infektion auftretenden Antikörpern abgrenzen. Besonders bei der Bekämpfung der Bruzellose ist es wichtig, daß die serologische Überwachung des Seuchengeschehens nicht "verschleiert" wird (32).

Ein weiterer Vorteil heterologer Impfstoffe ist bei der aktiven Impfung Neugeborener darin zu sehen, daß eine bereits vorhandene maternal übertragene passive Immunität nicht mit den Impfkeimen interferiert. Ein Beispiel ist

die heterologe Impfung von Welpen mit Masern-Virus gegen die Staupe.
Eine besonders günstige Voraussetzung zur Herstellung heterologer Vaccinen liegt dann vor, wenn eine Antigenverwandtschaft mit Kreuzimmunität gegen mehrere verwandte Erregerspezies gleichzeitig besteht. Hier kann man mit ein und demselben Impfstoff unterschiedliche Tierarten gegen verschiedene Infektionskrankheiten immunisieren. Ein Beispiel hierfür ist die Schutzimpfung von Rindern gegen Kuhpocken, von Pferden gegen Pferdepocken, von Elefanten gegen Elefantenpocken, von Kaninchen gegen Kaninchenpocken oder von Mäusezuchten gegen Ektromelie mit einem attenuierten Vaccinia-Virus, zum Beispiel mit dem von A. Mayr entwickelten Impfstamm MVA (63).

Wie schon erwähnt, liegt der spezielle Nachteil heterologer Impfstoffe darin, daß die Ausprägung der Immunität in der Regel schwächer ist als nach aktiver homologer Schutzimpfung, wobei Impfstoff (aktiv, inaktiviert, Subunit), Impfmodus und geimpfte Tierart einen wichtigen Einfluß haben. Durch Verwendung von Lebendimpfstoffen wird dieser Nachteil zwar gemindert, aber nicht vollständig ausgeglichen. Bei Impfstoffen aus inaktivierten Erregern oder Toxoidimpfstoffen muß man, um die gleiche Wirksamkeit wie bei homologen Impfstoffen zu erreichen, mit sehr viel mehr Antigenmengen pro Impfdosis arbeiten oder muß mehrmals hintereinander impfen. Ein extremes Beispiel hierfür ist die heterologe Impfung mit Tetanus-Toxoidimpfstoff gegen die durch Clostridium novyi hervorgerufene Erkrankung bei Mäusen. Für einen guten Schutz waren 13 Impfungen in 14-tägigem Abstand mit der 100-fach üblichen Tetanus-Toxoid-Dosis notwendig (94). Gemeinsam mit den homologen Lebendimpfstoffen bergen auch die heterologen Lebendimpfstoffe die Gefahr in sich, daß die verwendeten Impfstämme vom Impfling ausgeschieden werden bzw. in Schlachtprodukten persistieren und dann möglicherweise für die Umwelt, d.h. für andere Spezies, gefährlich sein können. So übertrugen zum Beispiel gegen Variola

schutzgeimpfte Kinder das Vaccinia-Virus auf empfängliche, in Kontakt mit ihnen lebende Haustiere. Zur Zeit wird im Zusammenhang mit den plötzlich enzootisch aufgetretenen Parvo-Enteritits-Myokarditis-Krankheiten der Hundepopulation diskutiert, ob ausgeschiedenes Nerzenteritisvirus, das in Lebendvaccinen gegen die Paulenkopenie der Katzen eingesetzt wird, auf Hunde übertragen wurde, die mit schutzgeimpften Katzen in enger Gemeinschaft lebten. Durch Hund-Hund-Passagen könnte sich das Nerzvirus adaptiert und letztlich die Parvovirusseuche verursacht haben.

In der Tiermedizin findet man momentan noch viel mehr heterologe Impfstoffe gegen Viruskrankheiten als gegen bakterielle Krankheiten, obwohl gerade unter Bakterien eine Menge Antigenverwandtschaften existieren und sogar die Bakteriensystematik zum Teil auf gemeinsamen oder verwandten Antigenen aufgebaut ist. Eben dieser scheinbare Widerspruch zeigt, daß eine Antigenverwandtschaft nicht notwendigerweise eine Kreuzimmunität impliziert und daß eine im Labor festgestellte Kreuzreaktion nicht immer Grundlage genug für die Produktion eines praktikablen heterologen Impfstoffes ist. Bei der Komplexität und Vielzahl bakterieller Antigene müssen bei Kreuzreaktionen nicht immer die immunisierenden Antigene mitbeteiligt sein. Zum anderen ist die Immunitätsbildung gegen bakterielle Krankheiten, von Ausnahmen wie starken Ektotoxinbildnern abgesehen, in der Regel labiler als bei Virusinfektionen, oftmals zellulär verankert oder durch eine Infektionsimmunität bedingt. Auch die Antikörperbildung führt nicht immer zur Bildung von lange persistierenden IgG. Die Nachteile bzw. Gefahren der heterologen Impfstoffe decken sich größtenteils mit denen homologer Lebendvaccinen, ihre zahlreichen Vorteile machen ihre weitere Entwicklung und ihren Einsatz für die Bekämpfung von Tierseuchen aus mehreren Gründen notwendig: 1. Fehlen homologer, wirksamer und unschädlicher Impfstoffe, insbesondere homologer Lebendimpfstoffe,

2. Eradikation einer enzootischen Verseuchung mittels Schutzimpfung mit dem Ziele der Erregerfreiheit,
3. Plurikausaler Schutz gegen Infektionskrankheiten, deren Erreger über Kreuzimmunitäten miteinander verwandt sind und die unterschiedliche Tierspezies befallen,
4. Notimpfung in bereits verseuchten Populationen,
5. Impfung von seuchenbedrohten Jungtieren, die möglicherweise noch einen maternalen, passiven Immunschutz besitzen,
6. Bevorzugung heterologer Impfstoffe bei annähernd gleicher Wirksamkeit wegen besserer Verträglichkeit und zur Vermeidung von Impferkrankungen,
7. Nutzung paraspezifischer Wirkungen,
8. Wirtschaftliche Vorteile.

2.3. Unterschiedliche Wirkungsmechanismen bei heterologen Impfstoffen

Als Eduard Jenner in den Jahren 1776 bis 1778 den ersten Impfstoff in der Geschichte der Medizin gegen die Menschenpocken (Variola) entwickelte und anwandte, hatte er zufällig auf der Basis des für den Menschen heterologen, vom Tier stammenden Vaccinia-Virus, einen Impfstoff zur Hand, der sich in der Immunitätsentwicklung qualitativ nicht von homologen Impfstoffen unterscheidet (Typ 1). Quantitativ können natürlich bezüglich Stärke und Dauer der Immunität Unterschiede bestehen, wobei je nach Impfstoffart zelluläre und humorale, bevorzugt zelluläre oder hauptsächlich humorale Mechanismen stimuliert werden, und zwar gleichgültig, welche Tierart geimpft wurde. Diese Wirkung (= Reaktionstyp 1) haben nur bestimmte heterologe Impfstoffe, und zwar:

1. Die heterologen Pockenimpfstoffe gegen die durch Orthopox-Viren verursachten Pockenkrankheiten bei Mensch und Tier auf der Basis des Vaccinia-Virus (beim Tier attenuierte Stämme), gegen Myxomatose mit Fibrom-Virus, gegen Lumpy skin mit Schafpocken-Virus, gegen Schafpocken mit Ziegenpocken-Virus, gegen Hühnerpocken mit Taubenpocken-Virus und gegen Stomatitis-Papulosa des Rindes mit ORF-Virus,
2. der heterologe Impfstoff gegen Marek-Disease mit Putenherpes-Virus, 3. der heterologe Impfstoff gegen die Parvo-Entero-Myokarditis der Hunde mit Panleukopenie- bzw. Nerzenteritis-Virus und 4. bestimmte heterologe Impfstoffe gegen bakterielle Krankheiten. In jedem Fall schützt die heterologe induzierte zelluläre Immunität gegen die betreffende Infektionskrankheit, die heterolog induzierten Antikörper reagieren mit dem Infektionserreger oder beide Vorgänge wirken zusammen.

Anders verhält sich der Schutzmechanismus nach heterologer Immunisierung gegen Paramyxovirus- und Coronavirus-Infektionen (Typ 2).

Eine Impfung von Hunden mit Masernvaccinen induziert zwar in Hunden eine zelluläre wie humorale Immunität gegen das Masern-Virus, die Masernantikörper reagieren dagegen nicht mit dem Staupevirus. Trotzdem sind die Hunde gegen Staupe geschützt. Ähnlich verhält es sich bei der heterologen Immunisierung von Schweinen mit dem FIP-Virus (feline infektiöse Peritonitis). Die Tiere waren zwar nach zweimaliger Impfung größtenteils gegen eine künstliche TGE (Transmissible Gastroenteritis)-Virus Infektion geschützt, hatten aber keine Antikörper, die mit dem TGE-Virus reagierten(104). Obwohl mehrere Erklärungen über die Ursache des Schutzes, wie heterolog-homologe-Interferenz oder Interferoninduktion existieren (40, 83), scheint es, daß hier die zelluläre Immunität dominiert (14, 34, 50), während humorale Kreuzreaktionen nicht bestehen. Die Rolle der Paramunität bedarf noch genauerer Untersuchungen. Neben diesen Gegebenheiten gibt es auch starke speziesspezifische Unterschiede. Hunde lassen sich gegen Staupe gut mit Masern- und Rinderpest-Virus immunisieren, Frettchen dagegen mit Masern-Virus schlecht, mit Rinderpest-Virus aber gut. Mit TGE-Virus geimpfte Katzen bilden nachweisbare Antikörper, die mit dem FIP-Virus kreuzreagieren, sie sind aber nicht gegen eine Erkrankung an feliner infektiöser Peritonitis geschützt(104). Dieses Beispiel einer heterologen Immunisierung mit Coronaviren zeigt, daß der Schutz gelegentlich auch nur "eingleisig" ausgebildet sein kann. Wirkungsmäßig bestehen bei heterologen Schutzimpfungen also Unterschiede, die durch die beiden Reaktionstypen 1 und 2 charakterisiert sind. Beide können für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten genutzt werden. Der Reaktionstyp 2 wird in der Regel nur für spezielle Fälle eingesetzt werden. Zum Beispiel eignet er sich gut zur aktiven Immunisierung von Jungtieren, die noch unter einem maternalen Immunschutz stehen, da die passiv über das Kolostrum oder intrauterin bzw. über das Ei vermittelten Antikörper nicht in Konkurrenz treten mit der Ausbildung einer aktiven Immunität.

Der Schutz nach Impfung mit heterologen Impfstoffen des Typs 2 ist in der Regel labiler und von kürzerer Dauer als bei homologen Impfstoffen.
Demgegenüber sind die heterologen Impfstoffe vom Reaktionstyp 1 grundsätzlich homologen Impfungen gleichzustellen, wobei ihre Vorteile entsprechend genutzt werden müssen. So ist zum Beispiel der Reaktionstyp 1 in all den Fällen anzustreben, in denen Populationen mit dem Ziele einer Eliminierung des Erregers geschützt werden sollen bzw. bei Notimpfungen, plurikausalem Schutz, oder weil er bezüglich Wirksamkeit und Unschädlichkeit homologen Impfstoffen überlegen ist. Auch in seuchenfreien Ländern, die von außen bedroht werden, sollte man heterologen Impfstoffen des Types 1 den Vorzug geben, weil es dadurch nicht zu einem Seßhaftwerden des Erregers kommt.

2.4. Bisher in der Praxis bewährte heterologe Impfstoffe

2.4.1. Gegen Viruskrankheiten

Der älteste heterologe Impfstoff wurde von Eduard Jenner aus Kuhpocken (vacca-vaccinia-vaccine) gewonnen und enthielt vermehrungsfähiges Vaccinia-Virus als immunisierendes Agens. Durch seine konsequente über einen langen Zeitraum weltweit legalisierte Anwendung gegen die Menschenpocken (Variola) gelang es, den Status der Seuchenfreiheit zu erreichen. Nach dem umfassenden Impfprogramm mit dem von der WHO empfohlenen Vaccinia-Stamm "Elstree" wurde jetzt von der gleichen Organisation die Ausrottung der Menschenpocken proklamiert und die Impfpflicht in den meisten Ländern aufgehoben. Unberücksichtigt blieb dabei, daß der Mensch durch die Impfung mit Vaccinia-Virus automatisch auch gegen alle menschenpathogenen Tierpocken der Gattung Orthopox (Ausnahme Ektromelie) geschützt war. Es ist mittlerweile allgemein bekannt, daß innerhalb der Gruppe der Orthopoxviren eine mehr oder weniger gut belastbare Kreuzimmunität besteht (63). Für die heterologe Immunisierung stellt das Vaccinia-Virus (beim Tier nur attenuierte Stämme) einen Idealfall dar, weil es einmal gegen mehrere verwandte Erregerspezies gleichzeitig eingesetzt werden kann und weil sich dabei die Immunität qualitativ, von der mit homologen Impfstoffen erzielten, nicht unterscheidet (Reaktionstyp 1). Einen Überblick über die heterologen Schutzimpfungen bei Pocken vermittelt Tabelle 2.

Nach dem Ende der Pockenimpfära wird der Mensch vermehrt durch die noch weit verbreiteten menschenpathogenen Tierpocken gefährdet, obwohl ein biologisches Reservoir für das Variola-Virus nicht zu existieren scheint (Affe?, Nager?). Außerdem muß man bei fehlendem Populationsschutz auch an einen kriminellen Mißbrauch des Variola-Virus denken (66). Die meisten Angehörigen der Streitkräfte werden nach wie vor gegen Pocken geimpft.

Tabelle 2:

Wirksamkeit einer heterologen Immunisierung gegen Pocken mit Lebendimpfstoffen

Art des Impfvirus	Impfung gegen	Schutzwirkung	Bemerkungen
Vaccinia-Elstree	Variola (Mensch)	+++	Bei Elstree postvacc.Reakt.möglich
Vaccinia-MVA CV 1/2			Bei MVA keine Gefahr
Vaccinia-MVA CV 1/2 (Genus Orthopoxviridae)	Kuhpocken Affenpocken Kaninchenpocken Ektromelie (Maus)	+++ +++ +++ ++	Impfung nur mit attenuierten Vacc. Stämmen z.B. MVA
Fibrom-Virus (Genus Leporipox)	Myxomatose (Kaninchen)	++	lokale Impfreaktion
Ziegenpocken-Virus (Genus Capripox)	Schafpocken	+	gelegentlich harmlose, lokale Hautreaktionen
Schafpocken-Virus (Genus Capripox)	Lumpy skin disease	++	gut verträglich
Taubenpocken-Virus	Hühnerpocken	+	gut verträglich
Putenpocken-Virus (Genus Avipox)	Hühnerpocken	++	postvacc. Reaktion möglich
Orf-Virus (Parapox)	Stomatitis Papulosa	+++	keine postvacc. Reaktion

Die heterologe Schutzimpfung mit Vaccinia-Virus wird auch weiterhin Bedeutung besitzen, wobei die derzeit günstige epidemiologische Situation Zeit zur Entwicklung neuer und unschädlicher Pockenimpfstoffe läßt.

Die Hühnerpocken wurden von der Entwicklung eines attenuierten homologen Hühnerpockenvirusstammes HP-1 (61) jahrelang mit heterologen Impfstoffen, entweder auf der Basis von Taubenpocken (59) oder Putenpocken-Virus (8) prophylaktisch bekämpft. Impfstoffe auf der Basis von Taubenpocken (sogenannte T-Stämme) waren praktisch auf der ganzen Welt in Gebrauch, während die Putenpocken-Impfstämme vor allem in Ungarn und Rumänien verwendet wurden. Bei letzteren kann es nach der Impfung bei Küken zu Impferkrankungen kommen, dafür ist die Immunitätsbildung gegenüber Hühnerpocken sehr viel besser (siehe Tabelle 2). Der neue homologe Hühnerpockenvirusstamm HP-1 hat sich mittlerweile auch als ausgezeichneter für den Säugetier-Organismus heterologer biologischer Paramunitätsinducer (PIND-AVI) bewährt (92). Nicht mehr aktuell sind auch die heterologen Impfstoffe aus Ziegenpocken-Virus zur Impfung gegen Schafpocken und die Impfstoffe aus Schafpocken-Virus gegen die Lumpy skin disease des Rindes. Beide Impfstoffe besaßen nur regionale Bedeutung, nämlich der Ziegenpockenimpfstoff im Vorderen Orient und der Schafpockenimpfstoff in Afrika (72, 86). Heute werden gegen die Schafpocken attenuierte homologe Impfstämme verwendet (89).
Auch jetzt noch im Einsatz und sehr nützlich ist die Impfung des Kaninchens gegen Myxomatose mit dem antigenverwandten Fibrom-Virus (29,85), weil es nach der Impfung mit dem homologen Impfstoff auf der Basis attenuierter Myxomatoseviren bei den meisten Impflingen zu kurzzeitigen Fieberreaktionen kommt. Die Vaccination mit Fibrom-Virus führt bei 90 % der Impflinge zu einer belastbaren Immunität, gelegentlich entwickeln sich bei jungen Kaninchen an der Impfstelle gutartige Fibrome, die sich nach kurzer Zeit

zurückzubilden. Derzeit finden beide Impfstoffarten je nach epidemiologischer Situation Verwendung (siehe Tabelle 2).

Die Antigenverwandtschaft unter den drei Paramyxoviren - Masern-, Staupe- und Rinderpest-Virus - ist schon lange bekannt und hat bis heute Anlaß zu vielfältigen Studien über den strukturellen Aufbau dieser Viren (18, 44), ihre immunologischen Beziehungen (76) und ihre Verwendung als heterologe Vaccinen (26, 44) gegeben. In der Praxis hat sich die heterologe Schutzimpfung von Welpen in der Neugeborenen-Phase mit attenuiertem Masernvirus gegen Staupe bewährt. Damit wird eine Minderung oder Unterdrückung der Immunitätsbildung durch eventuell noch vorhandene maternale Staupeantikörper verhindert (12). Die Welpen erhalten nicht nur einen nahtlosen Übergang von passiver zu aktiver Immunität, sondern auch einen schnellen aktiven Schutz, was besonders bei akuter Infektionsbedrohung (Zwingerhaltung) vorteilhaft ist.

Mit Masernvirus geimpfte Welpen sollen nach 4 - 6 Monaten mit homologen Staupeimpfstoff revacciniert werden. Mit einem homologen Impfstoff werden Jungtiere in der Regel erst nach dem Verschwinden der maternalen Immunität geimpft, das ist etwa ab der 6. - 8. Lebenswoche gegen Ende der Neugeborenen-Phase, und bis zur Ausbildung der aktiven Immunität sind die Welpen dann aber mehr oder weniger schutzlos (1). Die Kreuzreaktionen zwischen Masern-, Staupe-, Rinderpest-Virus und die sich daraus ergebenden möglichen heterologen Impfungen sind in Tabelle 3, 4 und 5 zusammengefaßt.

Tabelle 3:

Wirksamkeit einer heterologen Immunisierung verschiedener Tierarten mit Lebenimpfstoffen aus Paramyxoviren

SPEZIES	Art des Lebendimpfstoffes	postvaccinale Reaktion	Schutz gegen		Bemerkungen
			Art der Infektion	Bewertung	
HUND	Masern	keine	Staupe	gut^{+}	-
	Rinderpest	keine	Staupe	gut^{+}	-
FRETTCHEN	Masern	keine	Staupe	schlecht	nach Exposition leichte Erkrankungen
	Rinderpest	keine	Staupe	gut^{+}	-
RIND	Masern	keine	Rinderpest	kein Schutz	-
	Staupe	keine	Rinderpest	unsicher	nur nach wiederholten Immunisierungen gewisser Schutz

Anmerkung: $^{+}$ nach Exposition mit virulentem Virus lediglich kurzzeitiges Fieber

Tabelle 4:

Antikörperbildung nach heterologer Immunisierung mit Lebendvaccinen aus Paramyxoviren

SPEZIES	Art des Lebend-Impfstoffes	Antikörperbildung gegen:		
		Masern-Virus	Staupe-Virus	Rinderpest-Virus
MENSCH	Staupe	± (KBR)	+++(NT)	n.t.
AFFE	Staupe	0	+++(NT,KBR)	++ (NT,KBR)
	Masern	+++ (NT,KBR)	± (KBR)	+ (KBR)
	Rinderpest	0	± (NT)	+++ (NT,KBR)
HUND	Masern	+++ (KBR)	± (KBR)	+ (NT)
	Rinderpest	+ (KBR)	± (KBR)	+++ (KBR,NT)
FRETTCHEN	Masern	+++ (KBR)	+ (NT)	n.t.
RIND	Masern	0	0	+ (KBR)
	Staupe	0	+++ (NT,KBR)	0

Anmerkungen:

NT = Neutralisationstest KBR = Komplement-Bindungs-Reaktion

n.t. = nicht getestet

Tabelle 5:

Serologische Kreuzreaktionen bei Paramyxoviren

Immunseren	Antigene		
	Masern-Virus	Staupe-Virus	Rinderpest-Virus
Anti-Masern vom Menschen	+++	++	++
Anti-Staupe vom Hund	±	+++	++
Anti-Rinderpest vom Rind	++	+	+++

Die Mareksche Krankheit (Neuroencephalitis enzootica, Neuromyelitis, Polyneuritis intestinalis, Neurolymphomatosis), eine chronisch verlaufende Seuche bei Hühnern, wird nach wie vor in vielen Ländern durch Immunprophylaxe mit heterologer Lebendvaccine aus Putenherpesvirus (PHV) bekämpft. Daneben stehen auch homologe Impfstoffe aus attenuierten MAREK-Virusstämmen (MK) zur Verfügung (84). Beide Impfverfahren haben ihre Nachteile bedingt durch die Eigenart der Herpes-Infektionen, bei Mensch und Tier lebenslang zu persistieren, ohne daß Erkrankungen auftreten. Die homologen MK-Virusstämme sind belastet mit: Möglicher Virulenzsteigerung nach Serienpassagen in Küken, schlechter Vermehrung in Zellkulturen und geringer Stabilität bei der Lyophilisierung. Mit dem heterologen Putenherpesvirus-Impfstoff lassen sich etwa 75 % der Impflinge vor einer Krankheit, aber nicht vor einer Infektion mit MAREK-Virus schützen (87, 96). Leider können weder die homologe noch die heterologe Vakzination eine Infektion der Tiere und die Vermehrung von MAREK-Virus im Impfling verhindern.

Tabelle 6 zeigt die serologische Verwandtschaft einiger Herpesviren.

Tabelle 6:

Serologische Verwandtschaft verschiedener Herpesviren (direkte Immunofluoreszenz)

Antiseren gegen	V I R U S A N T I G E N E				
	Marek	Pseudowut	Infektiöse Laryngoytracheitis	Putenherpes	Equine Rhinopneumonitis
Marek	+++	+	-	(++)	-
Pseudowut	++	+++	-	-	-
Infektiöse Laryngotracheitis	-	-	+++	-	-
Putenherpes	(++)	-	-	+++	-
Equine Rhinopneumonitis	-	-	-	-	+++

Bemerkungen: (++) = wird zur heterologen Immunisierung gegen die Marek'sche Krankheit genutzt.

2.4.2. Gegen bakterielle Krankheiten

Die heterologe Immunisierung gegen bakterielle Krankheiten bleibt im Vergleich zur Virusinfektions-Bekämpfung nur auf wenige bewährte und bisher praktisch angewandte Impfstoffe beschränkt. Als Grundlage für Lebendimpfstoffe fehlen vor allem geeignete avirulente Bakterienstämme. Eine Ausnahme machen die Mykobakterien und Brucellen. Zur Schutzimpfung des Menschen gegen den klassischen Tuberkuloseerreger M. tuberculosis werden überwiegend BCG-Impfstoffe verwendet, die alle auf einen 1902 von Nocard aus einem tuberkulösen Kuheuter gezüchteten, ursprünglich hoch virulenten M. bovis-Stamm zurückgehen (19, 20).
Durch 230 Passagen auf Gallekartoffel-Nährboden verlor dieser Stamm an Virulenz, so daß er auch in hohen Dosen für den Menschen unschädlich ist (19). Der BCG-Impfstoff hat sich weltweit bei der Bekämpfung der Tuberkulose des Menschen bewährt. Empfohlen wird heute die Impfung bei Neugeborenen und exponierten Personen, die tuberkulinnegativ sind (97). Brucellenantigene, benutzt zur heterologen Immunisierung von Meerschweinchen und Kulturfiltrate bei Mäusen, zeigen im Belastungsversuch 100 %ige Kreuzimmunität zwischen Brucella abortus, suis und melitensis (47). In der Praxis angewandt wird die heterologe Immunisierung von Schafen mit einem lebenden attenuiertem B. melitensis-Stamm (Rev 1) gegen die von B. ovis verursachte, ansteckende Epididymitis in Südafrika. Nach einmaliger Impfung waren die Schafböcke vier Jahre gegen eine B. ovis-Infektion geschützt (38).

Auch an Rindern wurde der B. melitensis-Stamm (Rev 1) experimentell erprobt (25). Nach neuesten Untersuchungen (32) ist diese Vaccine der homologen, basierend auf dem Brucella abortus-Stamm 19, in ihrer immunisierenden Wirkung sogar überlegen (vergleiche Kapitel 2.6.).
Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über aktive Schutzimpfungen mit bisher bewährten heterologen Impfstoffen.

Tabelle 7:

Aktive Schutzimpfung mit bisher bewährten, heterologen Impfstoffen

Familie der Erreger		SCHUTZIMPFUNG mit	gegen
Pox-viridae	Orthopox	Vaccinia-Virus	Menschenpocken (Kuh-, Büffel-, Affen-, Kamel- und Mäusepocken)
	Avipox	Taubenpocken-Virus Putenpocken-Virus	Hühnerpocken
	Capripox	Ziegenpocken-Virus	Schafpocken
		Schafpocken-Virus	Lumpy skin disease
	Leporipox	Fibrom-Virus	Myxomatose
Paramyxoviridae		Masern-Virus	Staupe
Herpesviridae		Putenherpes-Virus	Marek disease
Mykobacteriaceae		Mycobycterium bovis	Tuberkulose des Menschen durch Mycobacterium tuberculosis
keiner Familie zugeordnet		Brucella melitensis	Brucella ovis-Infektion Brucella abortus-Inf.

2.5. Neu entwickelte heterologe Impfstoffe

2.5.1. Gegen Viruskrankheiten

Das Vaccina-Virus als Grundlage des von Jenner entwickelten ersten Pocken-Lebendimpfstoffes bildet auch die Basis des inzwischen nicht mehr zur Impfung von Erstimpflingen empfohlenen Virusstammes "Elstree". Dieses Virus hat innerhalb der Gruppe der Orthopoxviridae das größte Wirtsspektrum (62, 63). Es handelt sich dabei um kein harmloses Impfvirus, sondern für Tiere um einen potentiellen Krankheitserreger. Besonders leicht stecken sich Rind, Schwein, Pferd, Esel, Ziege, Schaf, Kaninchen, Affe, Büffel, Kamele, Elefanten und Zootiere mit dem Vacciniavirus an, wobei generalisierte Vacciniapocken bevorzugt bei Pferden, Kamelen, Elefanten, Schweinen, Kaninchen und bei Jungtieren auftreten. Aufgrund der unsicheren epidemiologischen Situation im Hinblick auf den kontinuierlichen Abbau des Populationsschutzes nach Aufhebung der Pflichtimpfung gegen Pocken wird von Fachleuten mehr und mehr ein sicherer Pockenimpfstoff, der auch als Notimpfstoff unbedenklich eingesetzt werden kann, gefordert (66).

Der von Mayr neu entwickelte MVA-Pockenimpfstoff (Modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara) ist bezüglich der Forderung nach Unschädlichkeit allen bisher gebräuchlichen Pockenimpfstoffen überlegen (64).
Er geht auf den Dermovaccinia-Stamm CVA zurück und erwies sich nach kontinuierlichen Passagen in Säugerzellen und Hühnerembryofibroblasten (FHE) im Tierversuch als avirulent.
Bemerkenswert ist ein völliger Verlust der Neurovirulenz. Eine Restriktionsanalyse der DNA des MVA-Virus ergibt im Vergleich zum CVA-Ausgangs-Virus sowie anderer Orthopoxviren einen Unterschied in der genetischen Struktur und ferner ein um 9 % verkürztes Genom, verglichen mit dem des WHO-Referenzstammes "Elstree" (64).

Damit haben wir sowohl für den Menschen als auch für das noch viel empfindlicher reagierende Tier einen attenuierten heterologen Pockenimpfstoff von genetischer Stabilität zur Hand, der zwar nicht ganz die immunisierende Potenz des "Elstree-Impfstoffes" erreicht, aber doch zu einer soliden Basisimmunität führt. Für eine dem "Elstree"-Stamm vergleichbare Immunitätsbildung muß er beim Menschen zweimal (subcutan) appliziert werden. Im Dezember 1976 wurde vom Bundesamt für Sera und Impfstoffe folgendes Impfverfahren für den Menschen zugelassen: Intracutane Verabreichung von MVA-Impfstoff, gefolgt von der herkömmlichen epicutanen Applikation des konventionellen Impfstoffes ("Elstree"). Mit dieser "Stufenimpfung" liegen umfangreiche klinische Erfahrungen vor (88, 91).

In der Tiermedizin hat sich die MVA-Vaccine bisher bewährt zur Schutzimpfung gegen die Elefantenpocken (33), gegen die Ektromelie der Mäuse und gegen Kaninchen- und Pferdepocken.

Das plötzlich seuchenhafte Auftreten einer Panleukopenie-ähnlichen Enteritis in der Hundepopulation, verbunden mit plötzlichen Todesfällen bei Welpen infolge Myokarditis in weiten Teilen Europas, machte rasches Handeln bezüglich der Ätiologie dieser neuen Krankheit und ihrer wirksamen Bekämpfung nötig. Frühere Meldungen über ähnliche Krankheitsbilder aus Australien und Kanada (31, 46) und intensive Bemühungen zur Erregerisolierung (9, 17) brachten bald Aufschluß über den Verursacher dieser neuen Hundekrankheit, ein canines Parvovirus. Als mögliche Prophylaxe gegen die Parvo-Gastroenteritis bzw. -Myokarditis bietet sich die heterologe Impfung an. Grundlage hierfür ist die enge Antigenverwandtschaft zwischen den drei Parvovirusarten (77): Felines und canines Parvovirus und Nerzenteritisvirus. Durch das canine Parvovirus gefährdete Hunde können mit attenuiertem oder inaktiviertem felinen

Parvovirus oder attenuierten Nerzenteritisviren immunisiert werden. Die aktive Schutzimpfung der Hunde mit dem heterologen Nerzenteritisvirus wird jedoch nicht empfohlen, da man befürchtet, daß sich das Nerzenteritisvirus eventuell durch Hund-Hund-Passagen auf die Hunde adaptieren kann und pathogen wird (vergleiche Kapitel 2.2.). Solange keine homologen Parvovirusimpfstoffe zur Verfügung stehen, sollte man deshalb das feline attenuierte oder noch besser das inaktivierte Parvovirus der Katze zur Impfung der Hunde gegen die Parvo-Gastroenteritis benutzen (4). In der Tabelle 8 sind die Kreuzreaktionen zwischen felinen und caninen Parvoviren wiedergegeben.

Große regionale Bedeutung, vor allem in Westafrika, hat die in den letzten Jahren entwickelte heterologe Impfung mit einer Rinderpestvaccine gegen den Erreger der "peste-des-petits-ruminants" (PPR), ein neues Morbillivirus (35). Lange Zeit fehlte ein geeigneter Impfstoff zur Bekämpfung dieser Krankheit, die für die Ziegenzucht in den betroffenen Ländern wirtschaftliche Bedeutung hat. Der Versuch attenuierte homologe Vaccinen zu entwickeln scheiterte an der Rest-Virulenz des PPR-Virus selbst nach 65 Passagen in foetalen Lammnierenzellen. Mit dem heterologen Rinderpestimpfstoff wird eine solide Immunität induziert, die Ziegen nach einmaliger Impfung mindestens 12 Monate vor einer Infektion schützt (93).

Tabelle 8

Antikörperbildung bei Katze und Hund nach natürlicher und künstlicher Immunisierung (Impfung mit Lebendvaccine) mit dem felinen Parvovirus (FPV)

SERA	Hämagglutinations-Hemmung mit Erythrozyten von Ktz., Schw. und AGM		Immun-Elektronen-Mikroskopie		Indirekte Immunofluoreszenz		Serum-Neutralisationstest	
	Antigen CPV	FPV	Antigen CPV	FPV	Antigen CPV	FPV	Antigen CPV	FPV
KATZE								
1. vor der Impfung	0	0	0	0	0	0	0	0
2. nach der Impfung	+	+	+	n.t.	+	+	++	+++
3. nach Exposition	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
HUND								
1. nach der Impfung	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+
2. nach Exposition	+	+	+	+	+	+	+	+

Anmerkungen: CPV = canines Parvovirus
AGM = African green monkey
n.t. = nicht getestet

2.5.2. Gegen bakterielle Krankheiten

Als heterolog im weiteren Sinn lassen sich auch die neuen E. coli-Impfstoffe auf der Basis von Fimbrien-Antigenen bzw. Enterotoxinen bezeichnen. Solche E. coli-Impfstoffe geben erstmals einen Serotyp-übergreifenden Schutz, weil zwischen den Fimbrienantigenen und den Antigenen des Enterotoxins der verschiedenen enteropathogenen Serotypen eine enge Verwandtschaft besteht. Bei den Fimbrienantigenen besteht eine nur Serotyp-übergreifende Verwandtschaft, die außerdem streng tierartspezifisch ist. So dominiert zum Beispiel bei den enteropathogenen E. coli-Stämmen des Ferkels das Fimbrienantigen K 88, beim Kalb dagegen das K 99. Impfstoffe mit dem E. coli-Enterotoxoid immunisieren nicht nur gegen das von den verschiedenen E. coli-Serotypen gebildete Enterotoxin, sondern auch gegen Enterotoxine anderer Erreger, wie Choleratoxin und Klebsiella hitzelabiles Toxin. Wie in Versuchen zur Anregung der Wassersekretion mit der in vivo-Marker-Perfusionstechnik am Rattenjejunum gezeigt, ist die Neutralisation mit Antiseren von Kaninchen vollständig kreuzweise ausgebildet (48, 49). Diese beiden Impfstofftypen (Fimbrienantigene und Toxoide) werden hauptsächlich, wie auch die Impfstoffe gegen Rotavirusdiarrhoe der Jungtiere (vergleiche Kapitel 2.6.), zur Immunisierung der Muttertiere empfohlen (5, 24, 74, 80, 90).

2.6. Mögliche Entwicklung neuer heterologer Impfstoffe

Neben den bisher beschriebenen, heterologen Impfstoffen lassen neue Erkenntnisse über Antigenverwandtschaften zwischen Erregern und Serotypen unterschiedlicher Pathogene die Herstellung neuer heterologer Impfstoffe möglich erscheinen. Genau wie bei den schon bewährten heterologen Impfstoffen liegt auch bei möglichen neuen Vaccinen der Schwerpunkt in der Bekämpfung viraler Erkrankungen. Großes wissenschaftliches Interesse hat in den letzten Jahren die Gruppe der Rotaviren gefunden. Bei der weiten Verbreitung und unbestrittenen Bedeutung der Rotaviren bei der Entstehung von neonatalen Durchfallerkrankungen von Mensch und Tier stellt sich zwangsläufig auch die Frage der Immunprophylaxe. Eine belastbare Kreuzimmunität konnte zwischen humanen, bovinen, equinen und porcinen Rotaviren nachgewiesen werden (103, 105). Rotavirus-Infektionen betreffen speziell die Neugeborenen, die noch enge Wechselbeziehungen zum mütterlichen Organismus haben und deren Abwehrsystem seine volle Reife und Funktion erst während der ersten 8 - 16 Lebenswochen erreicht. Das Infektionsrisiko ist aber während der ersten 7 - 10 Lebenstage am höchsten (6). Hier kommt in der Regel eine aktive Immunisierung zu spät. Eine passive heterologe Immunisierung wäre unsinnig, da die Antikörper den Ort des Infektionsgeschehens (Intestinaltrakt) nicht erreichen würden und diese Therapie umständlich und zudem unwirtschaftlich wäre. Hier bietet sich als ideale Prophylaxe die aktive Muttertierimpfung an. Zur Bekämpfung der Rota-Enteritiden der Neugeborenen müssen möglicherweise die orale oder andere Applikationen gewählt werden, damit im Kolostrum und in der Milch sekretorische IgA- und IgM-Antikörper enthalten sind, die bei neugeborenen Tieren bereits im Darmtrakt das Virus neutralisieren (5). Auch bei der Reisediarrhoe der Erwachsenen wird eine Mitbeteiligung von Rotaviren diskutiert. In diesen Fällen könnten die gefährdeten Personen prophylaktisch aktiv immunisiert werden.

Am Anfang stehen noch die Untersuchungen über die Nutzung der Antigenverwandtschaft zwischen dem Virus der transmissible Gastroenteritis (TGE) der Schweine und dem Virus der felinen infektiösen Peritonitis (FIP) aus der Familie der Coronaviridae. Derzeit gibt es keine Bekämpfungsmöglichkeiten dieser immer weiter verbreiteten Katzenseuche (43).

Erste Kreuz-Schutz-Tests an Katzen und Schweinen durch Immunisierung mit den heterologen Antigenen zeigen, daß eine belastbare Immunität offensichtlich nur "eingleisig" ausgebildet wird. Das heißt: Eine aktive Impfung von Katzen mit TGE-Virus konnte trotz hoher Titer TGE-Virus neutralisierender Antikörper das Haften einer experimentellen FIP-Infektion nicht verhindern, umgekehrt war bei mit FIP-Virus heterolog aktiv geimpften Schweinen serologisch keine Antikörper-Kreuzreaktion mit TGE-Virus nachweisbar, aber die Tiere erlangten gegen eine TGE-Virus-Belastung im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlichen Schutz (Reaktionstyp 2). Besonders effektiv verlief auch hier die aktive heterologe Muttertierimpfung von Schweinen mit FIP-Virus, wobei die Überlebensrate der Saugferkel 75 % im Vergleich zu 71 % bei homolog mit TGE-Virus aktiv immunisierten Muttersauen betrug (104).

Unter den verschiedenen Angehörigen der Familie "Coronaviridae" bestehen noch weitergehende Antigenverwandtschaften (11), die von Pedersen et al. auf Grund von indirekten und direkten Immunofluoreszenztests in zwei Gruppen unterteilt werden. Der ersten antigenverwandten Gruppe gehören an: Das Mäusehepatitisvirus Typ 3 (MHV 3), das haemagglutinierende Schweineencephalitisvirus (HEV 67N), das Kälberdiarrhoe verursachende Coronavirus (CDCV) und ein Coronavirusisolat vom Menschen OC43 (HCV -OC43).

Die zweite Gruppe wird repräsentiert durch das FIP-Virus, das TGE-Virus, ein humanes Coronavirusisolat (HCV-299E) und ein canines Coronavirus (CCV) (79).

Tabelle 9 zeigt diese Gruppierung unter den antigenverwandten Coronaviren.

Tabelle 9:

Gruppierung verschiedener Antigenverwandter Coronaviren

Antiseren gegen:	Virus-Antigene							
	MHV	CDCV	HCV-OC43	HEV-67N	TGEV	FIPV	HCV 229E	CCV
MHV	+++	++	+++	+++	-	-	-	-
CDCV	±	+++	++	+++	-	-	-	-
HCV-OC43	+++	++	+++	+++	-	-	-	-
HEV-67N	±	++	++	+++	-	-	-	-
TGEV	-	-	-	-	+++	+++	+	+++
FIPV	-	-	-	-	+++	+++	±	+++
HCV-229E	-	-	-	-	++	+	+++	-
CCV	-	-	-	-	-	-	-	+++

Reaktion im Immunofluoreszenztest:

- \- negativ
- ± kaum nachweisbar
- \+ schwach
- ++ mittelstark
- +++ stark, der homologen Reaktion entsprechend

Eingehender untersucht und verglichen wurden bisher die Antigene verschiedener vom Menschen stammender Coronavirusisolate mit dem Mäusehepatitisvirus Stamm 3 (51, 58) und dem haemagglutinierendem Encephalitisvirus des Schweines Stamm 67N (45). Infektionsbelastungsversuche nach aktiver heterologer Immunisierung mit diesen verwandten Coronaviren wurden noch nicht durchgeführt.

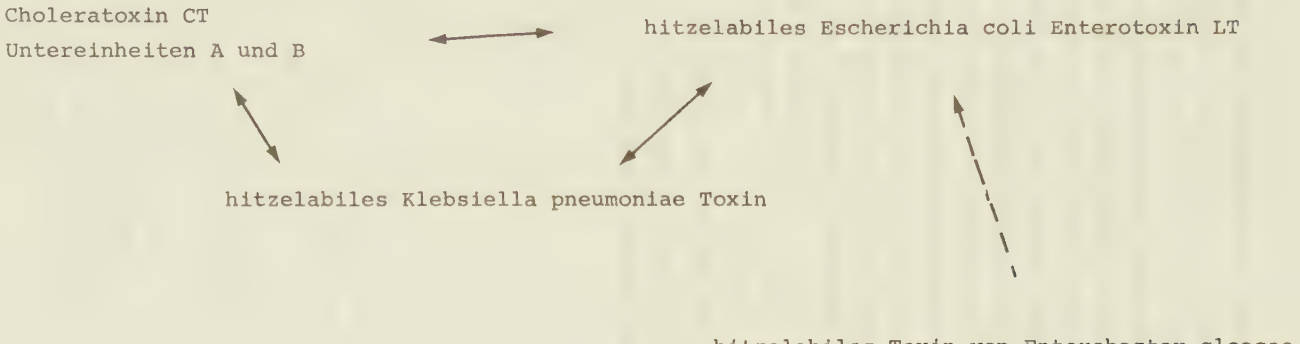
Die serologische Verwandtschaft des Erregers der Schweine-Vesikulärkrankheit (SVD-Virus) mit dem Coxsackie B 5-Virus einem menschenpathogenen Enterovirus, ist schon länger bekannt und für epidemiologische Forschungen von besonderem Interesse (13, 36). Eine klinisch inapparente SVDV-Infektion bei Laborpersonal war serologisch einwandfrei diagnostizierbar (13).
Nach heterologer Exposition von Schweinen mit dem Coxsackie B5-Virus sind keine klinischen Krankheitszeichen außer einem etwa drei Tage anhaltendem Temperaturanstieg auf 40 °C zu erkennen. Bei allen Versuchstieren lassen sich neutralisierende Antikörper sowohl gegen Coxsackie B5-Virus als auch gegen SVD-Virus kreuzreagierend nachweisen. Nach einer intravenösen Belastung mit dem SVD-Virus und auch bei Kontakttieren kann jedoch mühelos eine typische SVDV-Infektion klinisch diagnostiziert werden. Offenbar reicht hier die Antigenverwandtschaft nicht aus, um beim Schwein heterolog einen Schutz gegen die SVDV-Infektion zu stimulieren (53).

Nicht unerwähnt bleiben soll die Familie der Togaviridae, innerhalb derer zwischen einzelnen Spezies sehr enge Antigenverwandschaften bestehen. Bei den Gattungen der Pesti-, Alpha- und Flaviviren gelang es in vitro und in vivo, Antigenverwandtschaften nachzuweisen, wobei bei den Alphaviren (Gruppe A Arboviren) die Zell-vermittelte Immunität eine bedeutende Rolle spielt (78). Die Herstellung wirksamer heterologer Impfstoffe zur Krankheitsprophylaxe, zum Beispiel bei Equiden gegen EEE, VEE und WEE, ist denkbar (94).

Schließlich sei noch auf eine Antigenverwandtschaft zwischen dem Virus der Hundehepatitis (HCC canines Adenovirus 1) und dem caninen Adenovirus 2 hingewiesen, das zu Augen- und respiratorischen Krankheiten beim Hund führt. Eine homologe Schutzimpfung gegen das HCC-Virus schützt nicht gegen Erkrankungen durch canines Adenovirus 2. Eine Schutzimpfung der Hunde mit Impfstoffen aus caninem Adenovirus 2 vermittelt dagegen einen Schutz sowohl gegen HCC als auch gegen die Augen- und respiratorischen Krankheiten durch canines Adenovirus 2 (Reaktionstyp 2) (7).
Viel weniger als bei den Viren werden bei höher entwickelten Krankheitserregern Antigenverwandtschaften zur heterologen Immunisierung in Erwägung gezogen.
Die bereits erwähnte heterologe Immunisierung mit dem Brucella melitensis Stamm Rev. 1 scheint sich in der Bekämpfung und damit vereinfachten serologischen Überwachung der Rinderbruzellose zu bewähren (32).
Eine übergreifende Verwandtschaft zwischen dem hitzelabilen Enterotoxin von Escherichia coli und Untereinheiten (A und B) des Choleratoxins zeigt, daß zukünftig heterologe Impfstoffe aus Spaltprodukten höher organisierter Mikroorganismen oder deren gereinigten und inaktivierten Toxinen (Toxoiden) größere Erfolgsaussichten haben. Das Choleratoxin zum Beispiel ist eines der am besten identifizierten Bakterientoxine (MG ca. 85.000) mit etwa fünf identischen B-Untereinheiten zu einem Ring geordnet, in den die relativ schwach immunisierende A-Untereinheit eingebaut ist. Mit Hilfe dieser isolierten Untereinheiten und verfeinerten serologischen Methoden (ELISA) war es möglich, die schon länger bekannte serologische und auch Kreuz-Schutzreaktion des Choleratoxins mit dem hitzelabilen E. coli Enterotoxin (en) (48, 75, 81) sozusagen in den immunisierenden Details zu untersuchen (21, 41).
Tabelle 10 zeigt die immunologischen Beziehungen einiger Bakterientoxine.

Tabelle 10:

Serologische Kreuzreaktionen und heterologer Kreuzschutz mit verschiedenen Bakterientoxinen



⟷ vollständige Kreuzreaktion und Kreuzschutz

- — - → eingleisige schwache Kreuzreaktion, keine Schutzwirkung

Auf eine für die Humanmedizin aussichtsreiche heterologe Schutzimpfung gegen die Gruppe B-Streptokokken-Sepsis bzw. -Meningitis der Neugeborenen weisen Fischer et al. hin (30).
Serologische Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Serotypen von Streptokokkus pneumoniae und anderen Streptokokken sind bekannt (22), aber nur Streptokokkus pneumoniae Typ 14 und die Gruppe B Streptokokken Typ III scheinen antigenetisch ausreichend übereinzustimmen, um in vivo heterolog einen ausreichenden Schutz zu verleihen. Eine heterologe Schutzimpfung der Mütter mit Streptokokkus pneumoniae Typ 14 wird als sinnvollste Prophylaxe gegen die Gruppe B Streptokokken-Erkrankungen der Neugeborenen empfohlen (30).

Innerhalb der Ordnung Rickettsiales gibt es zahlreiche und vielfältige Antigenverwandtschaften. Als praktikable Nutzung wäre eine heterologe Vaccine auf der Basis von Rickettsia montana gegen das von Rickettsia rickettsii verursachte Rocky Mountain spotted fever denkbar (28).
Bestimmte parasitäre Erkrankungen sind noch immer sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin schwer zu bekämpfen. In neuerer Zeit gewinnt die Immunprophylaxe gegen diese Krankheiten an Bedeutung, nachdem man immunisierende Komponenten einiger pathogener Parasiten oder ihrer Entwicklungsstadien (Trematoden, Cestoden) charakterisiert hat. Interessant ist wiederum der richtungsweisende Einfluß der immunisierten Spezies für den heterolog stimmulierten Schutz. Bei der heterologen Schutzimpfung gegen die Schistosomiasis zum Beispiel, schützen den Rhesusaffen Schistosoma bovis, S. matthei und S. japonicum gegen eine S. mansoni-Infektion, den Pavian dagegen S. rodhaini und S. bovis und die Maus S. bovis, S. matthei und S. rodhaini. Manche Forscher glauben hierbei an einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der heterologen Schutzwirkung und der Stellung des heterologen immunisierenden Agens in der Phylogenese der Schistosomen (99).

Eine Immunantwort auf eine Cestodeninfektion ist durch die Anwesenheit spezifischer Antikörper und mittels Hauttests nachgewiesen, was den Versuch einer aktiven Immunisierung rechtfertigt (100). Im Modell der Nager-Cysticercose konnte durch Implantation reifer Larven von entweder Taenia taeniaeformis oder Taenia crassiceps bei Ratten ein guter Schutz gegen eine orale Belastung mit Taenia taeniaeformis erreicht werden (73). Eine andere heterologe Immunisierung mit Hymenolepsis microstoma bei Mäusen bewirkte eine starke Immunantwort mit gutem Schutz gegen eine Belastung mit Hymenolepsis diminuta, allerdings nur "eingleisig" ausgebildet (42). Nach Isolierung gut gereinigter, stark immunisierender Parasitenantigene ist die Möglichkeit der heterologen Immunisierung bei der Parasitenbekämpfung verheißungsvoll.

In Tabelle 12 a und b sind einige Beispiele neuer möglicher heterologer Immunisierungen bei Viren, Bakterien, Toxinen und bei Parasitosen zusammengefaßt.

Tabelle 12 a:

Mögliche Entwicklungen neuer heterologer Virus-Impfstoffe

Antigen-verwandte Erreger	Kreuzreaktion im serologischen Test	Heterologer Impfstoff	zur Impfung bei	Schutz gegen
Rotaviren Mensch-Rind	+ (CF,ELISA)	humanes-bovines Rotavirus	Rind, Mensch	Rota-Kälberdiarrhoe Rota-Diarrhoe der Kinder
Coronaviren FIP-TGE	-	FIP-Virus	Schwein	transmissible Gastroenteritis (TGE)
Mäusehepatitis-Virus - humane Coronaviren	+ (CF,ELISA)	n.t.	Mensch?	Coronavirus-erkrankungen
Coxsackie B_5 Virus - SVDV (swine vesicular disease-V.)	+ (CF,ELISA)	n.t.	Mensch? (Schwein)	Coxsackie B_5-Infektionen (SVD)
Canines Adenovirus 1 - canines Adenovirus 2	+ (CF)	Canines Adenovirus 2	Hund	HCC,Augen-und respir.Erkrankungen
Gruppe A Arboviren (VEE, EEE, WEE)	+ (NT)	VEE, EEE, WEE-Virus, nur Lebendimpfstoff	Equiden	Encephalitis (VEE, EEE, WEE)

n.t. = nicht getestet

Tabelle 12 b:

Mögliche Entwicklungen neuer heterologer bakterieller und sonstiger Impfstoffe

Antigen-verwandte Erreger	Kreuzreaktionen im serologischen Test	Heterologer Impfstoff	Zur Impfung bei	Schutz gegen
Bakterien u. Toxine				
Vibrio cholerae - E.coli Enterotoxine	+ (NT)	V.cholerae Toxin/Toxoid	Mensch Tier	Coli-Diarrhoe
Gruppe B Streptokokken Typ III - Streptokokkus pneumoniae Typ 14	+ (BcA)	Streptokokkus pneumoniae Typ 14	Mensch	Neugeborenen-Streptokokken-sepsis - Meningitis
Rickettsia rickettsii - Rickettsia montana	+ (IF)	Rickettsia montana	Mensch?	Rocky Mountain spottet fever
Parasiten				
Hymenolepis microstoma - H.diminuta	+ (BMR)	H.microstoma	?	H.diminuta-Infektion
S.bovis, S.japonicum, S.matthei, S.rodhaini - S.mansoni		?	?	S.mansoni-Infektion

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Tiermaterial

Es wurden 12 institutseigene Rinder, die unter kontrollierten Bedingungen in der Klinik gehalten wurden, am 31. Januar 1979 mit der ORF-Vaccine 9 aktiv geimpft. Ein Tier - Kalb 8 - wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt (am 23. Juli 1980) zum ersten Mal und dann noch weitere dreimal (am 13. August 1980, 9. September 1980 und 24. September 1980) mit 2 ml gereinigtem ORF-Virus D 1701 subcutan immunisiert.
Die Tiergruppe war nach Alter (zum Zeitpunkt der Erstimmunisierung), Rasse und Geschlecht zusammengesetzt, wie aus Tabelle 13 zu ersehen ist.

Tabelle 13:

Liste der Versuchstiere

Geschlecht	Rasse	Ohrmarken-Nr. bzw.Herkunft	Alter bzw. Geburtstag
1 Stier	Afrik.Zwerg-rind(Dahome)	181	5 Jahre
1 Ochse	"	135	5 Jahre
1 Kuh	"	136	4 1/2 Jahre
1 Kuh+	HFV	9917295	4 Jahre
1 Färse+	"	-	4 Jahre
1 Kuh	Afrik.Zwerg-rind(Dahome)	132	3 Jahre
1 Kuh	"	133	2 1/2 Jahre
1 Kuh	"	296	2 1/2 Jahre
1 Stier	schwarzbunt	7454245	2 Jahre
1 Kalb weibl.+	HFV	182	14 Monate
1 Kalb weibl.+	"	183	14 Monate
1 Kalb weibl.+	"	2	7 Monate
1 Kalb°	"	3	5 Monate
1 Kalb°+	"	4	5 Monate
1 Kalb*+	"	8	5 Monate
1 Kalb'	Afrik.Zwerg-rind(Dahome)	Mutter 132	geb.22.3.1979
1 Kalb'	"	Mutter 136	geb.28.3.1979
1 Kalb'	"	Mutter 296	geb. 6.5.1979

' nicht immunisiert
* viermal immunisiert
+ Hauttest
° experimentell infiziert
HFV Deutsches Höhenfleckvieh

3.1.2. Impfstoff

Ausgangsmaterial

Das Ausgangsmaterial für die Gewinnung des ORF-Impfstammes D 1701 wurde aus Pustelmaterial aus dem Maulbereich eines an schwerer, tödlich verlaufender, generalisierter Pustulardermatitis (Ekthyma) erkrankten Lamm isoliert (108).

Verlauf der Attenuierung des ORF-Stammes D 1701

Nach der erfolgreichen Anzucht des Ausgangsmaterial auf Nierenkulturen vom foetalen Schaf (ENL, Vermehrung unter Ausbildung eines cytopathischen Effektes mit Riesenzellen, Zellverschmelzungen und anschließendem granulären Zerfall der Zellsynzytien) wurde nach dem üblichen Verfahren kontinuierlich in sekundären Nierenkulturen von Schaffoeten weiter passiert (übliche Trypsinierungstechnik, Anzuchtmedium: Earle'sche Lösung mit 10 % LA und 10 % FKS, Erhaltungsmedium: 5 % LA und 2 % FKS, übliche Antibiotikazusätze).
Insgesamt sind 135 kontinuierliche Kulturpassagen durchgeführt worden. Das Passagematerial wurde stets am Höhepunkt des cytopathischen Effektes gewonnen und wieder weiter verimpft. Es erfolgte eine dauernde bakteriologische und virologische (Elektronenmikroskop) Kontrolle, zweifelhafte Passagen wurden verworfen. Der Virustiter stieg mit zunehmender Passagenzahl kontinuierlich an: Virustiter der Ernte nach der 2. Passage: $10^{4,5}$, nach der 11. Passage: $10^{6,75}$ und nach der 135. Passage: $10^{8,5}$ KID_{50}/ml.

Die Virusernte der 135. Passage wurde dreimal mittels Plaquetechnik nach der Endverdünnungsmethode gereinigt, um ein genetisch einheitliches Virusmaterial zu erhalten. Das Virus aus der 3. Plaquereinigung wurde dann in sekundären Nierenkulturen von Schaffoeten vermehrt, gereinigt und bakteriologisch wie virologisch (Elektronenmikroskop, Serologie) nochmals überprüft. Es konnten auf

diese Weise 2 Liter hergestellt werden, die nach Abschluß der Kontrollen ohne Zusatz lyophilisiert, portioniert (a 4 ml) und bei -80 ^{o} C gelagert wurden. Für die Herstellung des Lebendimpfstoffes diente dieses Material als Saatvirus. Der Titer des Saatvirus Stamm O D 1701 war $10^{8,5}$ KID_{50}/ml und nach dem Lyophilisieren $10^{7,5}$ KID_{50}/ml.

Plaquereinigung

Für die Plaquereinigung wurden Schälchen- (Animpfung) und Röhrchenkulturen (Vermehrung der Plaques) benutzt. Die Plaqueschälchen wurden nach der bekannten Methode mit Nierenzellen von Schaffoeten (1. Subkultur) angelegt. Verimpft wurden Virusverdünnungen (10^{-4}-10^{-6}) auf jeweils drei Schälchen (0,2 ml pro Schälchen). Nach zweistündiger Adsorptionszeit wurde mit 3 ml 2 %igem Difco-Agar und doppeltem Eagle Earle und 10 % FKS (Mischungsverhältnis 1 : 1) überschichtet. Die Plaques wurden aus den Verdünnungen 10^{-4}, 10^{-5} und 10^{-6}, nach einer Bebrütungszeit (37^{o} C) von 4 - 5 Tagen im CO_2-Brutschrank, gestochen und auf frische Röhrchenkulturen überimpft (2. Subkultur mit Anzuchtmedium Earle und 2 % FKS und 5 % LA). Dies ergab die erste Plaquereinigungspassage. In gleicher Weise wurde eine zweite und eine dritte Plaquereinigung vorgenommen, wobei das in den Röhrchen angezüchtete Virus jeweils wieder auf Plaqueschälchen ausgesät wurde. Die Färbung der beimpften Schälchenkulturen zum Sichtbarmachen der Plaques wurde mit 1 %iger Neutralrot-Stammlösung 1 : 100 mit steriler PBS-Lösung verdünnt durchgeführt. 3 ml dieser Verdünnung wurden auf die Agarschicht gegeben, nach zwei Stunden Einwirkungszeit (Diffusion durch die Agarschicht und Anfärben des Zellrasens) mußte die Flüssigkeit wieder abgesogen werden. Hierbei handelte es sich um eine Schnellfärbung, das Plaquestechen erfolgte sofort anschließend.

Herstellung der ORF-Vaccine 9

Für die Herstellung der ORF-Lebendvaccine 9 wurden BEL-Zellen (bovine embryonic lung) als heterologes Zellsystem verwendet. Die Herstellung erfolgte nach der üblichen Trypsinierungstechnik in vier Penicillinflaschen a 250 ml Medium. Das Zellsediment der Anzuchtpassage wurde bakteriologisch und mykologisch nach den internationalen Vorschriften auf Kontaminationen untersucht. Die Beobachtungszeit der flüssigen und festen Nährböden (aerob und anaerob) betrug 14 Tage bei 37 °C und Zimmertemperatur (20 - 24 °C).
Zur Virusanzucht diente die 1. Subkultur mit einem Erhaltungsmedium aus Eagle Earle und 2 % Laktalbumin und 2 % foetalem Kälberserum, mit dem üblichen Antibiotikazusatz und 2 % Phenolrot.Für die Animpfung der sekundären foetalen Kälberlungenkulturen wurde jeweils frisches Saatvirus des ORF-Stammes O-D 1701 (plaquegereinigtes Virus, siehe vorher) verwendet, das zwecks Adaptierung vorher je 1 - 2 Passagen in sekundären Lungenkulturen aus Kälberfoeten durchlief.
Am 10. Januar 1979 wurden die Penicillinflaschen mit je 4 ml ORF-Virus der 135. ENL-Kulturpassage (plaquegereinigtes Saatvirus) beimpft. Das Virus-Zellsystem wurde am dritten Tag post infectionem (stationäre Lagerung bei 37 °C, cpE am Höhepunkt) geerntet, für weitere zwei Tage bei + 4 °C im Kühlschrank gelagert und schließlich bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Zur endgültigen Verwendung als Impfstoff wurde die gesamte Menge (ca. 1 Liter) aufgetaut, zusammengeschüttet und 3 Minuten beschallt, für die Virustitration, die elektronenoptische Kontrolle sowie zur weiteren Verwendung als Animpfmaterial wurden 9 Portionen a 5 ml abgenommen. Als Stabilisierungsmittel wurde dem Pool eine Lösung aus 50 % Saccharose und 5 % Gelatine, in Aqua dest. gelöst und eine Stunde im Dampftopf sterilisiert, zugesetzt, so daß die End-

konzentration in der Virussuspension 10 % Saccharose und 1 % Gelatine entsprach. Diese Menge (1.200 ml) mit einem pH-Wert von 6,9 wurde in Glasfläschchen a 4 ml abgefüllt und anschließend lyophilisiert. Das Material stellte den gebrauchsfertigen ORF-Zellkultur-lebendimpfstoff dar. Der Virustiter betrug vor dem Lyophilisieren $10^{8,0}$ KID_{50}/ml und nach dem Lyophilisieren $10^{7,0}$ KID_{50}/ml. Die elektronenoptische Kontrolle am 22. Januar 1979 ergab: Überwiegend morphologisch intakte ORF-Viruspartikel.

3.1.3 Impfmodus

Die ORF-Vaccine 9 wurde bei allen Tieren stets subcutan am Triel appliziert. Am 31. Januar 1979 (11 Uhr) wurde jedem der 12 Rinder eine Dosis von 4,0 ml des Impfstoffes gelöst in Aqua dest. mit steriler Kanüle subcutan injiziert. Die Injektionsstelle wurde markiert. 3 1/2 Monate später, am 15. Mai 1979 wurden dieselben Tiere nochmals mit 4,0 ml des gleichen Impfstoffes wiederum subcutan an anderer Stelle in den Triel geimpft.
Drei Kühe waren zum Zeitpunkt der Erstimmunisierung trächtig, und zwar das Tier mit der Ohrmarken-Nr. 132-6 1/2 Monate, das mit der Ohrmarken-Nr. 136-6 Monate und das mit der Ohrmarken-Nr. 296-5 Monate.

3.1.4. Untersuchungen über die Unschädlichkeit und Wirksamkeit des Impfstoffes

3.1.4.1. Unschädlichkeitsprüfungen

Alle Rinder der Versuchsgruppe waren vom Zeitpunkt der ersten Impfung bis vier Monate nach der Bossterimpfung (am 15. Mai 1979) unter ständiger klinischer Kontrolle. Jeweils nach der Impfstoffapplikation wurde eine Woche lang täglich zweimal die Temperatur gemessen und das Allgemeinbefinden (Freßlust, eventuell allergische Reaktionen) kontrolliert. Die Injektionsstellen wurden hinsichtlich lokaler Reaktionen besonders aufmerksam beobachtet und palpiert. Im Hinblick auf die Ausbreitung des Impfvirus wurden mehrere im gleichen Stall mit den Impflingen gehaltene nicht geimpfte Rinder, darunter auch drei neugeborene Kälber, klinisch und serologisch überprüft.

3.1.4.2. Wirksamkeitsprüfungen

Durch den Nachweis erstens der Antikörperbildung, serologisch im Labor (in vitro),und zweitens der zellvermittelten Immunität am lebendem Tier (in vivo) mittels Intracutantest, sowie drittens durch einen Infektionsbelastungsversuch wurde einmal die Wirksamkeit der ORF-Vaccine 9 und zweitens durch serologische und intracutane Kreuztests eine ausgebildete Kreuzimmunität mit dem Virus der Stomatitis Papulosa bovis untersucht.

Antikörperbildung

Zum Nachweis einer Antikörperbildung und deren quantitativer Erfassung wurde neben dem konventionellen Neutralisationstest in Röhrchen eine immunenzymatische Reaktion, der enzyme linked immunosorbent assay ELISA, eingesetzt. Einige Seren wurden auch mit einem Neutralisationstest in Mikroplatten aus Plastik (siehe Abbildung 1) ausgetestet.

Neutralisationstest in Röhrchenkulturen

Es wurden insgesamt 130 Seren von 18 Rindern sowie die Kollostralmilch von drei Kühen am ersten und zweiten Tag nach der Geburt untersucht. Der Test wurde in Glasröhrchen, bewachsen mit Monolayern foetaler Kälberlungenzellen, durchgeführt. Zwei Tage nach der Aussaat waren die Kulturen in der Regel dicht und erhielten als Erhaltungsmedium Earle MEM mit einem Zusatz von 2 % foetalem Kälberserum, 2 % Laktalbuminhydrolysat, 2 % $NaHCO_3$ und Antibiotika. Der Mediumwechsel wurde meist kurz vor der Beimpfung der Kulturen vorgenommen.
Die zu testenden Seren wurden zunächst 30 Minuten im Wasserbad bei 56 ^{o} C inaktiviert. Danach wurden alle Seren, auch das positive und negative Kontrollserum, in Zweierpotenzen mit NaCl-Phosphat-Puffer verdünnt (pH 7,8).

Zu den einzelnen Verdünnungsstufen wurde die gleiche Virusmenge (1 ml und 1 ml), eingestellt auf 100 KID_{50} in einer Verdünnung zwischen 10^{-3} und 10^{-4}, je nach Titer des verwendeten Gebrauchsvirus, hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad und anschließend über Nacht (ca. 16 Stunden) bei + 4 °C im Kühlschrank zur in-vitro-Inkubation aufbewahrt. Parallel zum Hauptversuch mit den Testseren wurden jeweils die üblichen Serum- und Viruskontrollen angesetzt. Nach abgelaufener Bindungszeit erfolgte die Verimpfung der Reatkionsgemische und Kontrollen auf die Zellkulturröhrchen. Die Impfdosis betrug o,2 ml pro Röhrchen, es wurden jeweils vier Röhrchen mit dem gleichen Reaktionsgemisch beimpft. Danach wurden die beimpften einschichtigen Zellkulturen 9 - 12 Tage bei 37 °C im Brutschrank stationär belassen und täglich mit dem Lichtmikroskop auf cytopathische Veränderungen (cpE) kontrolliert. Der cpE wurde zur Berechnung der Neutralisations- und Virustiter nach der Methode von Behrens und Kärber (65) verwendet.

Neutralisationstest in Mikroplatten

Anstelle von Zellkultur-bewachsenen Glasröhrchen wurden hierfür Mikroplatten der Firma Falcon mit 96 Flachvertiefungen zum Einpipettieren der Reaktionsgemische und des Zellkulturansatzes verwendet. Der Unterschied zum Röhrchen-Neutralisationstest besteht darin, daß zuerst das Serum-Virus-Reaktionsgemisch mit einem Volumen von je 50 µl in die Mikroplattenvertiefungen gefüllt wurde (Inkubationszeiten und Mischungsverhältnis wie vorher) und anschließend sofort die Zellsuspension aus foetalen Kälberlungen in einem Medium aus Earle MEM und 5 % Laktalbuminhydrolysat und 5 % foetalem Kälberserum und 2 % $NaHCO_3$ und Antibiotika mit ebenfalls je 50 µl überschichtet wurde. Die Mikroplatten wurden im CO_2-Brutschrank (bei 37 °C) sechs Tage lang aufbewahrt und

jeden Tag mit dem Lichtmikroskop auf Wachstum der Zellkultur und cytopathischen Effekt kontrolliert. Die üblichen Serum- und Viruskontrollen wurden in gleicher Weise angesetzt, es wurden mit diesem Test 40 Seren untersucht.

Enzyme linked immunosorbent assay ELISA

Diese von Engvall und Perlmann (27) sowie van Weeman und Schuurs (98) eingeführte Technik hat inzwischen weitverbreitete Anwendung in der Virologie sowohl für den Antigen- als auch für den quantitativen Antikörpernachweis gefunden. Letzterer wurde in Form der "Indirekten Methode" in Immunolon-Flachbodenmikroplatten (Flow Laboratories, Bonn) durchgeführt. Als erster Schritt war hierfür die Antigen-Beschichtung der mit 96 Vertiefungen versehenen Platten nötig. Dazu war eine Reinigung des ORF- bzw. Stomatitis Papulosa bovis-Virus erforderlich.

Antigenreinigung: Eine möglichst große Menge (in der Regel 2 Liter) des benötigten Antigens ORF-Virus D 1701 der 25. BEL-Kulturpassage einerseits und Stomatitis papulosa-Virus V 660/74 der 4. BEL-Kulturpassage (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bachmann) andererseits wurde nach verschieden langer Lagerzeit bei - 80 ^{o} C aufgetaut und jeweils ein Virus-Pool gebildet. Ein Pool von 1,25 Liter ORF-Virus D 1701-Suspension (25. BEL-KP vom 9. Januar und 11. Januar 1980, Medium wie vorher) wurde drei Minuten beschallt und anschließend einer einmaligen Fluorcarbon-Behandlung (siehe Mayr et al. "Virologische Arbeitsmethoden II", S. 107) unterzogen. Dieses vorgereinigte Virusmaterial wurde nun 150 Minuten lang bei 23.000 x g (+ 4 ^{o} C) zentrifugiert (Beckman L5 50 Ultrazentrifuge). Danach verblieb das Material über Nacht im Kühlraum (+ 4 ^{o} C). Am nächsten Tag wurden die abzentrifugierten Viruspellets in 1 ml Tris-Puffer aufgenommen (0,001 M, pH 8,9) und durch 35 % Sucrose (3 ml Sucrose, 1 ml Virus)

bei 18.000 Upm 80 Minuten lang zentrifugiert. Das Sediment wurde wiederum in Tris-Puffer (0,001 M, pH 8,9) aufgenommen und gegen Tris-Puffer dialysiert. Damit war die Antigenreinigung abgeschlossen.
An Stomatitis Papulosa bovis-Virus standen 1000 ml der 4. BEL-Kulturpassage vom 4. Dezember 1979 zur Verfügung (Erhaltungsmedium wie vorher). Die Reinigung verlief wie die ORF-Virus-Reinigung, allerdings wurde hier zweimal mit Fluorcarbon gefällt.

Immunserum: In Ermangelung eines geeigneten Rinderimmunserums gegen das ORF- bzw. Stomatitis Papulosa-Virus benutzten wir ein Schafimmunserum (Nr. 7 Dr. Heryln) gegen ORF-Virus in einer Standardverdünnung von 1 : 160. Der Titer dieses Serums im Plaque-Reduktionstest lag bei 1 : 1280.

Negativ-Kontrollserum: Als Negativ-Kontrolle stand uns das Serum eines kollostrumfrei, isoliert aufgezogenen Kalbes (K 3) zur Verfügung.

Konjugat: Es wurden zwei im Handel bezogene Konjugate eingesetzt, und zwar ein Anti-Rind-Konjugat der Firma Miles Laboratories in der Gebrauchsverdünnung 1 : 200 und ein Anti-Schaf-Konjugat der Firma Nordic in der Gebrauchsverdünnung 1 : 500.

Plattenbeschichtung: Zur Plattenbeschichtung wurde nach dem Austesten in einer ELISA-Schachbrettitration gegen positives und negatives Bezugsserum die geeignete Antigengebrauchsverdünnung mit Coating-Puffer (Karbonat-Bikarbonat pH 9,6 = 1,59 g Na_2CO_3 und 2,93 g $NaHCO_3$ in 1000 ml Aqua dest.) hergestellt: Für ORF-Virus 1 : 80, für Stomatitis papulosa-Virus ebenfalls 1 : 80.
Pro Plattenvertiefung wurden 100 µl der Antigengebrauchsverdünnung einpipettiert und dann die Platten drei Stunden bei 37 °C und 16 Stunden bei + 4 °C inkubiert. Eine Lagerung der mit Folien verschlossenen Platten bei - 20 °C war mindestens sechs Monate lang ohne Aktivitätsverlust möglich. Vor Verwendung wurden die Platten aufgetaut und

dreimal mit Aqua dest. mit 0,05 % Tween 20 gründlich gewaschen. Unmittelbar daran folgte die Beschichtung mit Testserumverdünnungen in NaCl-Tween 20, pH 7,4 (von 1 : 5 bis 1 : 640, je 100 µl pro Vertiefung), immer wurde ein positives und negatives Kontrollserum in den Test miteinbezogen. Nach einer Stunde Inkubation auf dem Rotor bei 37 ^{o} C erfolgte viermaliges Waschen mit Aqua dest. - Tween 20 und Trockenschütteln, ehe pro Plattenvertiefung 100 µl der Konjugatgebrauchsverdünnung in Konjugat-Puffer (NaCl-Phosphat-Puffer, ohne Tween, aber mit 5 % FKS) zugegeben wurde. Nach einer weiteren Stunde Einwirkungszeit bei 37 ^{o} C wurde erneut viermal mit Aqua dest./ Tween 20 gewaschen und schließlich das Enzymsubstrat mit dem Indikator in die Vertiefungen (100 µl) gegeben. Als Indikator diente 1.2 Phenyldiamin Hydrochlorid ($2{,}945 \times 10^{-3}$ M), das in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem auf 80 ^{o} C erwärmten 0,01 M Citrat-Phosphatpuffer mit 4,67 g/l Zitronensäure und 9,15 g/l $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ gelöst wurde bis zu einer Endverdünnung von 0,005 %. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten wurde die Ablesung visuell und zusätzlich durch photometrische Auswertung mit einem Multiscan-Gerät (Flow Laboratories) mit Absorptionsmessung direkt durch den Boden der Mikroplatte unter Verwendung eines 510 nm Filters vorgenommen.

Hauttest

Bei sieben von den 13 heterolog mit ORF-Vaccine Nr. 9 immunisierten Rindern und bei einem mit Stomatitis Papulosa-Virus V 660 künstlich infiziertem Kalb (K 4) wurden zum Nachweis der zellvermittelten Immunität Intracutantests drei Monate nach der heterologen Boosterimpfung durchgeführt. Am 27. August 1979 (15 Uhr) wurden bei den genannten Tieren je 0,1 ml vermehrungsfähiges ORF-Virus, Feldstamm Grub (vom 12. Juli 1979) der 4. BEL-Kulturpassage (Abstammung 3. ENL-KP., Titer auf der Zellkultur $10^{7,5}$ KID_{50}/ml) an der linken Trielseite in die vorher geschorene und sorgfältig gereinigte Haut mit sterilen Tuberkulinkanülen

verimpft. Es wurden vier Verdünnungsstufen (Verdünnungsmittel NaCl-PP, pH 7,5) von unverdünnt bis 1 : 1000, von kranial nach kaudal in Abständen von etwa 20 cm intracutan appliziert.
An der rechten Trielseite erhielten dieselben Tiere in gleicher Weise je 0,1 ml Stomatitis Papulosa bovis-Virus V 660, Feldstamm der 4. BEL-Kulturpassage (Abstammung 3. BEL-KP., Dr. Schalaby, Titer auf der Zellkultur $10^{7,75}$ KID_{50}/ml) in den vier Verdünnungsstufen.
Die Anzucht der Virus-Feldstämme erfolgte in beiden Fällen auf foetalen Kälberlungenzellen (BEL, Schlachthofmaterial) mit einem Erhaltungsmedium aus EARLE MEM, 2 % FKS, 2 % LA und 2 % $NaHCO_3$.
Als Kontrollgruppen dienten elf ungeimpfte Kälber, davon sieben sechs Wochen alt und vier sechs Monate alt. Bei diesen Tieren wurde sowohl das genannte ORF-Feldstammvirus als auch das Stomatitis Papulosa-Feldstammvirus sowie verschiedene andere Virusarten mit den dazugehörigen Zellsystemen und Erhaltungsmedien isoliert bezüglich der Stimulation einer allergischen Hautreaktion intracutan getestet.
Tabelle 14 und 15 beinhalten eine Aufstellung der verwendeten Substanzen.

Als positive Kontrolle der Hautreaktion wurde die intracutane Verabreichung eines stark Lymphozyten-stimulierenden Pflanzenmitogens, des Phytohaemagglutinin: PHA (Wellcome Beckenham, England: purified PHA, HA 16/17) gewählt.

Tabelle 14:

Verschiedene Virusarten, Zellsysteme und Erhaltungsmedien, appliziert im Hauttest bei ungeimpften Kälbern

Virusart, Genus	Titer in der Zellkultur	Zur Vermehrung benutzte Zellkultur	Erhaltungsmedium
A.V. Aujeszky-Virus Stamm H2 - NP Genus: Herpetoviridae	γ-inaktiviert 1061 krad am 17.1.1979	BHK 18.Babyhamsternieren-Kulturpassage vom 20.12.1978	L 15 mit 2 % FKS
T.-T.V. Teschen-Talfan-V. Stamm Konratice Genus: Enteroviridae	$10^{8,5}$/ml	ENS 10.foetale Schweinenieren-Kulturpassage vom 22.12.1971	RAF ohne Zusätze
NDV Newcastle Disease-V. Stamm Hitschner B1 Genus: Paramyxovirus	$10^{9,5}$/ml	7. Eipassage vom 2.3.1979	Allantoisflüssigkeit vom Huhn
RpV Rhinopneumonitis-V. Stamm RAC - H Genus: Herpetoviridae	1:112 (HAH)	RK 13 2.Kaninchennieren-Kulturpassage (Zelllinie) vom 5.8.1978	TC 199 mit 10 % FKS
PIND-AVI Avipox-Virus flüssig Stamm HP 1 Genus:. Poxviridae	$10^{7,5}$/ml	FHE 440.Hühnerembryofibroblasten-Kulturpassage vom 31.7.1979	RAF ohne Zusätze
ORF V. ORF-Virus Stamm D 1701 Parapoxviridae	$10^{7,5}$/ml	BEL 4.foetale Kälberlungen-Kulturpassage vom 12.7.1979	Earle MEM mit 2 % FKS, 2 % Laktalb.
St.Pap.b.V. Stomatitis Papulosa-V. Stamm V 660/74 Parapoxviridae	$10^{7,75}$/ml	BEL 4.foetale Kälberlungen-Kulturpassage vom 13.7.1979	Earle MEM mit 2 % FKS, 2 % Laktalb.

Positive Kontrolle: Gereinigtes Phytohaemagglutinin (PHA), HA 16/17 Wellcome Reagents Limited, Beckenham, England

Tabelle 15:

Hauttest bei ungeimpften Kälbern mit verschiedenen Virusarten, Zellsystemen und Erhaltungsmedien nach Tabelle 14

Kalb Ohrmarken-Nr.	Alter	Impfstelle	Impfmaterial: 0,1 ml (unverdünnt) intracutan appliziert
737	6 Wo.	Rechte Trielseite:	ORF-V.in Earle MEM + 2%FKS, 2%LA
		Linke Trielseite:	BEL-Zellen in Earle MEM
1455	6 Wo.	Rechte Trielseite:	St.Pap.b.V.in Earle MEM + 2%FKS,2%LA
		Linke Trielseite:	BEL-Zellen in Earle MEM
2086	6 Wo.	Rechte Trielseite:	PIND-AVI in RAF ohne Zusätze
		Linke Trielseite:	FHE-Zellen in RAF ohne Zusätze
6767	6 Wo.	Rechte Trielseite:	NDV in Allantoisflüssigkeit (Huhn)
		Linke Trielseite:	Earle MEM mit 2%FKS, 2%LA
2491	6 Wo.	Rechte Trielseite:	RpV. in TC 199 mit 10%FKS
		Linke Trielseite:	RK 13 - Zellen in PBS
5562	6 Wo.	Rechte Trielseite:	A.V.γ-inaktiviert in L 15 mit 2%FKS
		Linke Trielseite:	T.-T.V. in RAF ohne Zusätze
2493	6 Mo.	Rechte Trielseite:	St.Pap.b.V.in Earle MEM + 2%FKS,2%LA
		Linke Trielseite:	BEL-Zellen in PBS (10 ml)
10513	6 Mo.	Rechte Trielseite:	ORF-V.in Earle MEM + 2%FKS,2%LA
		Linke Trielseite:	BEL-Zellen in PBS (10 ml)
291	6 Mo.	Rechte Trielseite:	RpV.in TC 199 mit 10%FKS
		Linke Trielseite:	RK 13 - Zellen in PBS (10 ml)
292	6 Mo.	Rechte Trielseite:	A.V.γ-inaktiviert in L 15 + 2%FKS
		Linke Trielseite:	Gereinigtes Phytohaemagglutinin (PHA) (HA 16/17) 0,1 mg in 0,2 ml PBS

FKS = Foetales Kälberserum

LA = Laktalbuminhydrolysat

PBS = Phosphate Buffered Saline (nach Dulbecco und Vogt)

3.1.4.3. Infektionsbelastungsversuch und immunsuppressive Behandlung

Die experimentelle Infektion von Kälbern mit Stomatitis Papulosa-Zellkulturvirus führt trotz Ausschöpfung verschiedener Applikationsarten - intracutan, subcutan, submukös, intramuskulär, intraperitoneal und intravenös - in der Regel nur in knapp 50 % der Fälle zu klinisch einwandfrei als "angegangen" zu beurteilende Infektionen (55).

Wir versuchten am 18. Juni 1979 ein zwei Wochen altes Kalb (K 3) mit 10 ml plaquegereinigtem Stomatitis papulosa bovis-Virus V 660 der 12. BEL-Passage, Titer: $10^{6,5} KID_{50}$/ml, intravenös experimentell zu infizieren. In Anbetracht der relativ hohen Wahrscheinlichkeit eines Infektionsmißerfolges mit der intravenösen Virusbelastung eines gesunden Tieres wurde ein zweites, gleich altes Kalb (K 4) vor der Belastung mit dem gleichen Virusmaterial (10 ml i.v.) immunsuppressiv behandelt. Dazu verabreichten wir täglich eine Woche lang ein in der Humanmedizin zur Verhütung von Abstossungsreaktionen nach Organtransplantationen und zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten benutztes Immunsuppressivum - IMUREK^{R} (Wellcome GmbH) - mit der Wirksubstanz Azathioprin. Die Dosierung betrug 2 mg/kg. Während der gesamten Therapie und noch bis 8 Tage nach der künstlichen Infektion wurde täglich eine Leukozytenzählung mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer vorgenommen und ein Differentialblutbild angefertigt. Die permanente klinische Überwachung (Temperaturmessung, Kontrolle des Allgemeinbefindens, Verhaltens und der Futteraufnahme) mit besonderem Augenmerk auf die Prädilektionsstellen - Gingiva, Zunge, Flotzmaul - einer beginnenden Stomatitis papulosa bovis war die wichtigste Maßnahme zur Feststellung einer gelungenen Infektion.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Unschädlichkeit

Nach Verabreichung der heterologen ORF-Vaccine 9 kam es bei keinem der geimpften Tiere zu lokalen oder allgemeinen postvaccinalen Reaktionen. Der Impfstoff wurde schnell resorbiert. Auch Empfindlichkeitsreaktionen an der Injektionsstelle fehlten, es wurden weder Temperaturanstiege noch Veränderungen des Blutbildes beobachtet, die Futteraufnahme blieb normal.
Für eine Impfvirusübertragung per Kontakt auf nicht geimpfte, im gleichen Stall neben den Impflingen gehaltene Rinder ließen sich weder klinisch noch serologisch Anhaltspunkte eruieren. Drei Kälber von Kühen (132, 136, 296), die im letzten Drittel der Gravidität zum ersten Mal immunisiert wurden (siehe Kapitel 3.1.3.) kamen nach normalem und vollständigem Ablauf der Tragezeit durch physiologische Geburt gesund zur Welt. Die Neugeborenen hatten direkten Kontakt mit den Impflingen und blieben während der ganzen Versuchsdauer klinisch gesund. Der Nachweis einer Antikörperbildung bei den ungeimpften Rindern und Kälbern gegen das Impfvirus (Röhrchen- und Mikroplatten-Neutralisationstest sowie "ELISA") verlief negativ.

3.2.2. Wirksamkeit

3.2.2.1. Bildung humoraler Antikörper

Die vor der Impfung gewonnenen Seren (Nullseren) der Versuchstiere reagierten im Röhrchen- und Mikroplatten-Neutralisationstest negativ. In den Seren der Tiere nach der Erstimpfung ließ sich in einem Zeitraum bis zwölf Wochen post vaccinationem mit dem Röhrchen- und Mikroplatten-Neutralisationstest (Serumverdünnungsmethode) ab der Verdünnung 1 : 4 keine Antikörper weder gegen ORF-Virus D 1701 noch gegen Stomatitis Papulosa-Virus V 660 nachweisen.

Die Revaccination erfolgte nach dreieinhalb Monaten. 14 Tage nach der Boosterimpfung reagierten sechs von 52 Seren im Neutralisationstest positiv. Die Titer waren jedoch niedrig und erreichten nur Werte von 1 : 4. Der neutralisierende Effekt der positiven Seren wirkte sowohl gegen ORF- als auch gegen Stomatitis Papulosa-Virus. Die Neutralisationskinetik ließ jedoch bei beiden Virusarten auf eine partielle Neutralisation schließen. Nach vier Tagen war sie gegenüber den Kontrollen vollständig, nach zehn Tagen Beobachtungszeit kam es dagegen bei zwei Neutralisationsgemischen in den Zellkulturen noch zur Ausbildung von bis zu fünf Plaques. Die entsprechenden Kontrollen waren zu diesem Zeitpunkt dagegen 100%ig lysiert. In den Abbildungen 1 und 2 sind die Zellkulturbilder am vierten Tag nach der Beimpfung mit den Neutralisationsgemischen (Abb. 1) und den entsprechenden Kontrollen (Abb. 2) wiedergegeben.

Mikroplatten-Neutralisationstest

Abbildung 1

Rinderlungen-Zellkultur, vier Tage nach Beimpfen mit dem Reaktionsgemisch: Rinderserum (133, zwei Wochen nach der Boosterimpfung)-ORF-Virus D 1701, Serumverdünnung 1 : 4, Vergrößerung 40fach, kein zytopathischer Effekt.

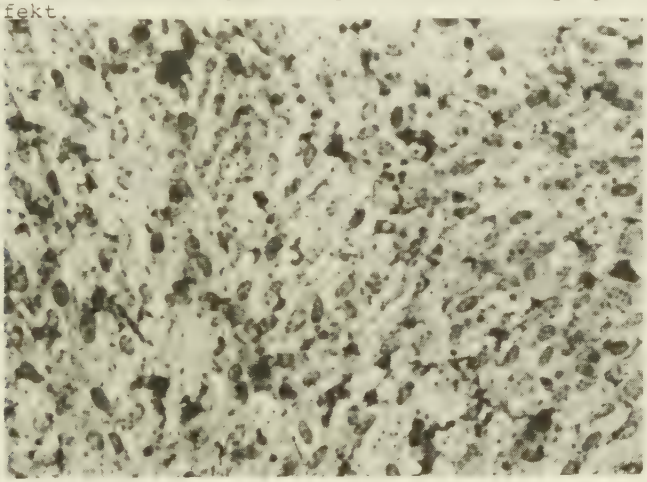
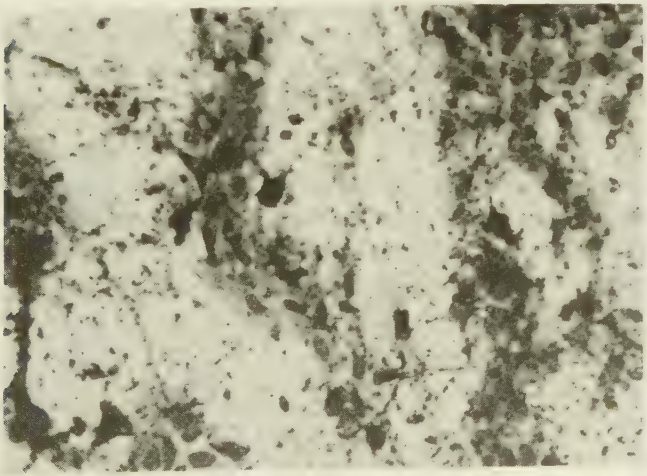


Abbildung 2

Negative Kontrolle: Rinderlungen-Zellkultur, vier Tage nach Beimpfen mit FKS (foetales Kälberserum)-ORF-Virus D 1701-Reaktionsgemisch, FKS-Verdünnung 1 : 4, Vergrößerung 40fach, Lysis der Zellkultur.



Mit der enzymimmunologischen Nachweismethode "ELISA" wurden die vor der Erstimmunisierung (Nullseren) und die nach der Boosterimpfung gewonnenen Seren aller heterolog immunisierten Rinder auf das Vorhandensein von humoralen Antikörpern der IgG-Klasse gegen ORF-Virus D 1701 und im Kreuztest gegen Stomatitis Papulosa Virus V 660 untersucht.

Auf der Grundlage des 50 % Extinktionswertes des positiven Schaf-Referenzserums Nr. 7, Standardverdünnung 1 : 160, wurden alle Extinktionswerte über 0,436 als positiv gewertet. Sieben nach der zweiten, dritten und vierten Boosterimpfung von Kalb 8 gewonnene Seren (eineinhalb Wochen und in weiteren Abständen von je zwei Wochen post revaccinationem) reagierten auf der mit ORF-Virus beschichteten Immunolonplatte in der Verdünnung 1 : 5 mit einer Extinktion von durchschnittlich 0,6 und erreichten in Zweierpotenzen weiterverdünnt konstant abfallend in der Verdünnung 1 : 80 den Endpunkt der positiven Reaktion (Extinktion 0,470). Das vor der Erstimmunisierung gewonnene Serum dieses Tieres (K 8) vom 23. Juli 1980 wies in der Anfangsverdünnung (1 : 5) eine Extinktion von 0,190 auf.
Sämtliche auf den ORF-Virus beschichteten Platten getestete Boosterseren der übrigen Rinder lagen in der Ausgangsverdünnung von 1 : 5 mit Werten zwischen 0,45 und 0,58 nur knapp über dem positiven Extinktions-Referenzwert von 0,4 (Schaf Nr. 7). Alle Nullseren blieben unter der festgesetzten positiven Extinktionsgrenze bei einem durchschnittlichen Wert von 0,150.

In den Kreuztesten, die mit Stomatitis Papulosa-Virus V 660 beschichteten Immunolonplatten durchgeführt wurden, reagierten nur die sieben erwähnten Seren von Kalb 8, in durchschnittlich um ein Zehntel niederen Extinktionswerten als homolog gegen ORF-Virus, positiv.

Die Versuche beweisen, daß mit ORF-Vaccine geimpfte Rinder nach der Erstimpfung serologisch nachweisbar nicht, nach einer Zweitimpfung unregelmäßig und dann nur mit sehr niedrigen Titern reagieren. Der "ELISA-" Test scheint gegenüber dem Neutralisationstest keinen Vorteil zu bringen.

Die Ergebnisse überraschen nicht. Sie stimmen mit den bisherigen Erfahrungen, wonach die Immunantwort gegenüber dem Virus des Stomatitis Papulosa hauptsächlich zellulär ausgebildet wird, gut überein. Das heterologe ORF-Virus dürfte eine Antikörperbildung im Rind noch schwächer stimulieren.

3.2.2.2. Nachweis zellulärer Immunreaktionen

Der Nachweis zellulärer Immunreaktionen wurde mittels Intracutantest nach dem Modell der Tuberkulin-Reaktion geführt (16). Drei Monate nach der Boosterimpfung (sechseinhalb Monate nach der Primovaccination) wurde bei sieben Impflingen mit je 0,1 ml homologem ORF- und heterologem Stomatitis Papulosa-Feldvirus (siehe Kapitel 3.1.4.2.) ein Hauttest durchgeführt.
Bei allen Tieren war eine lokale Allergiereaktion vom verzögerten Typ seitens des Hautorgans feststellbar, die folgendermaßen bewertet wurde:

NEGATIV: Örtlich begrenzte Schwellung der Hautfalte von höchstens 2 mm im Vergleich zur durchschnittlichen normalen Hautdicke an der Impfstelle, gemessen mit dem Federkutimeter nach Prof. Dr. Götze (Fa. Hauptner, Solingen). Keine klinischen Erscheinungen wie Schmerzempfindung an der Impfstelle, teigige Konsistenz, Exsudation, umschriebene Nekrose und (oder) Mitentzündung der regionalen Lymphknoten(gefäße).

POSITIV: Örtlich begrenzte oder ausgedehnte Schwellung der Hautfalte von mindestens 2 mm Umfang mit oder ohne den erwähnten klinischen Erscheinungen.

Eine weitere quantitative Bewertung wurde nach dem Ausmaß der der Hautfalten-Schwellung vorgenommen (siehe Tabelle 16).

Beide Impfantigene wurden, in Zehnerpotenzen bis 1 : 1000 ausverdünnt, in Abständen nebeneinander auf der Haut ausgetestet. Dabei konnte bei drei Tieren im homologen Test und bei zwei Tieren auch im Kreuztest noch bei der Antigenverdünnung 1 : 100 die Hautreaktion als positiv (+) gewertet werden. Die Reaktion in der höchsten Verdünnungsstufe (1 : 1000) verlief dann bei allen Tieren negativ. Nachdem die unverdünnte Virustestmenge (0,1 ml) immer bei vorher sensiblisierten Tieren (Impflinge) eine positive Allergie hervorrief, die dann in den weiteren drei Verdünnungsstufen langsam linear auf Null abfiel, liegt eine typische Dosis-Wirkungsreaktion vor.

Tabelle 16

Hautreaktion 3 1/2 Monate nach der Boosterimpfung mit ORF-Vaccine 9 bei Rindern am 2. Tag nach intracutaner Applikation von je 0,1 ml ORF- bzw. Stomatitis Papulosa-Virus.

TierNr. Alter	Hautdicke (mm vor dem Versuch)	Bewertung der Intracutan-Reaktion mit ORF-Virus			Stomatitis Papulosa-Virus		
		unverdünnt	1 : 10	1 : 100	unverdünnt	1 : 10	1 : 100
Färse 4 Jahre	11,5	+++	+	0	+++	0	0
9917295 4 Jahre	10,5	+	+	0	+++	+	0
182 14 Mo.	10,5	+++	+++	+	+++	+++	0
183 14 Mo.	13,0	+++	++	+	+++	++	++
K 2 7 Mo.	4,5	+++	++	0	+++	++	0
K 4 5 Mo.	4,0	++	0	0	+++	++	0
K 8 5 Mo.	5,5	+++	++	+	+++	++	+

Bewertung: + Örtlich begrenzte Schwellung von mehr als 2 mm Dicke mit oder ohne klinische Erscheinungen wie Rötung, teigige Konsistenz, Exsudation, zentrale Einschmelzung oder Verschorfung.

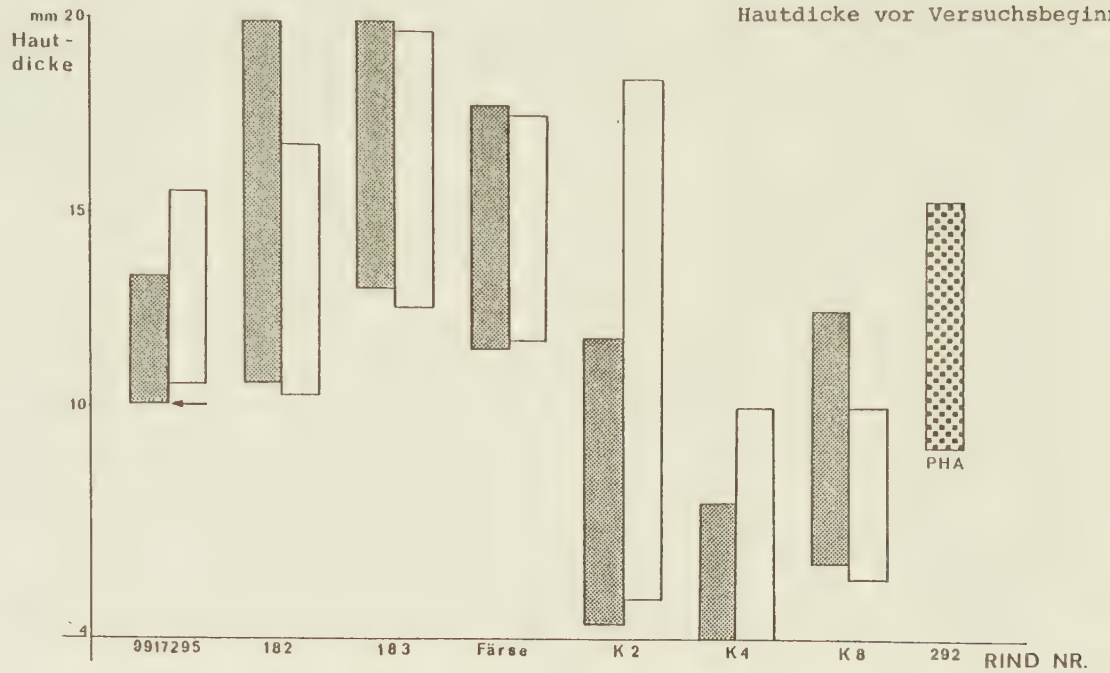
++ Schwellung > 3 mm

+++ Schwellung > 4 mm

Dies spricht für eine in hohem Maße Antigen-spezifische Reaktion. Zur Prüfung der Spezifität der Hautreaktion auf das Impfvirus bzw. das Stomatitis Papulosa-Feldvirus wurden sämtliche im Impfstoff enthaltene Komponenten, wie Erhaltungsmedium und zur Virusvermehrung benutztes Zellsystem, isoliert in der Haut getestet. Sie verursachten keinerlei Hautreizung.
Weiterhin konnten bei ungeimpften Kontrollrindern mit sehr verschiedenen viralen Antigenen (siehe Kapitel 3.1.4.2. "Hauttest") und den dazugehörigen Zellsystemen sowie Erhaltungsmedien (siehe Tabelle 14 und 15) keine Hautreaktionen provoziert werden. Eine Ausnahme machte das als positive Kontrolle eingesetzte Phytohaemagglutinin (PHA) durch Stimulation einer entzündlichen Hautschwellung von über 6 mm Dicke gegenüber der normalen Hautdicke an der Impfstelle (von 9 mm Ø auf 15,4 mm Ø). In der Abbildung 3 ist die Hautdickenzunahme in mm nach intracutaner Verabreichung von 0,1 ml unverdünntem ORF-Virus D 1701 (homolog) und Stomatitis Papulosa-Virus V 660 (heterolog) sowie PHA-Kontrolle dreieinhalb Monate nach der Boosterimpfung mit ORF-Vaccine 9 in einer Beobachtungszeit von sieben Tagen schematisiert dargestellt.

Abbildung 3:.

Hautreaktion bei sieben mit ORF-Vaccine 9 heterolog geimpften Rindern dreieinhalb Monate nach der Boosterimpfung: Zelluläre Allergie auf 0,1 ml unverdünntes, intracutan verimpftes ORF-Virus D 1701 (gepunktet) bzw. Stomatitis Papulosa-Virus V 660 (weiß), positive Kontrolle: Phytohaemagglutinin (PHA), Beobachtungszeit: 7 Tage.



3.2.3. Infektionsbelastungsversuch

Die experimentelle Infektion eines gesunden, unbehandelten Kalbes (K 3) mittels intravenöser Applikation von 10 ml Stomatitis Papulosa-Zellkulturvirus (Titer: $10^{6,5}$ KID_{50}/ml) führte während einer Beobachtungszeit von zehn Tagen zu keinerlei klinisch erfaßbaren Krankheitszeichen. Auch eine Erregerausscheidung, die mittels Virusisolierung aus täglich entnommenen Nasentupferproben kontrolliert wurde, trat nicht auf.
Erfolgreich verlief jedoch eine Stomatitis Papulosa-Virusinfektion bei einem mit dem Immunosuppressivum "IMUREK^{R}" vorbehandeltem Kalb (K 4).
Das cirka 80 kg schwere Kalb erhielt über einen Zeitraum von neun Tagen (26.7.1979 bis 4.8.1979) "IMUREK^{R}" in einer Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht intravenös einmal täglich verabreicht. Die Belastung mit 10 ml Stomatitis Papulosa-Zellkulturvirus (Titer. $10^{6,5}$ KID_{50}/ml) intravenös, wurde am vorletzten Tag der immunsuppressiven Therapie vorgenommen. Bis dahin war die täglich kontrollierte Leukozytenzahl auf Grund der zytostatischen Wirkung des Medikaments von anfänglich 6000/mm^3 auf 4100/mm^3 gefallen, das heißt, um etwa 1000 unter die niedrigste noch physiologische Zahl von 5000/mm^3. Als Purinantagonist greift Azathioprin (Antimetabolit, Wirksubstanz von "IMUREK^{R}") durch Konkurrenz in die Nukleinsäuresynthese ein und hemmt die normale Immunzellbildung hauptsächlich auf der Ebene der wenig differenzierten Vorstufen der weißen Blutzellen. Eine Abnahme der Lymphozytenzahl kurz nach der Virusbelastung (siehe Tabelle 18) findet sich regelmäßig in der ersten Phase eines derartig massiven Infekts als Ausdruck der sogenannten "ersten Kampfphase", hier noch begünstigt durch die Immunsuppression. Acht Tage nach der experimentellen Infektion und eine Woche nach Absetzen der immunsuppressiven Therapie haben sich sowohl die Lymphzyten- als auch die Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen wieder normalisiert. Einen Überblick über das Differentialblutbild von Kalb 4 während der immunsuppressiven Behandlung und nach der Virusbelastung gibt Tabelle 17.

Tabelle 17:

Differentialblutbild von Kalb 4 nach immunsuppressiver Behandlung (IMUREK^{R}) und experimenteller Infektion mit Stomatitis Papulosa-Zellkulturvirus

Zeitlicher Verlauf	Temp. ^{o}C	Leukozyten-zahl	Lympho-zyten	Eosino-phile	Stab-kernige	Segment-kernige	Mono-zyten	Klinisches Bild
26.7.1979 1.Tag der IMUREK^{R}-Behandlung	38,1	6.000/mm^{3}	54	6	7	20	13	o.b.B.
2.8.1979 nach einer Woche IMUREK^{R}-Behandlung	38,4	4.300/mm^{3}	67	4	2	21	6	o.b.B
3.8.1979 exper.Infektion 10ml SP-Virus i.v.	38,5	4.100/mm^{3}	74	0	2	24	0	o.b.B.
6.8.1979 IMUREK^{R} abgesetzt drei Tage post inf.	38,7	7.050/mm^{3}	43	6	7	32	12	Schleimhaut-läsionen, typisches Bild einer Stomatitis Papulosa
11.8.1979 acht Tage post inf.	38,2	8.300/mm^{3}	65	0	5	29	1	Restitutio ad integrum

Im Verlauf der klinischen Überwachung wurden am dritten Tag post infectionem leicht gerötete Stellen auf der Maulschleimhaut und am Flotzmaul festgestellt. Einen Tag später zeigten sich mehrere linsengroße gerötete Herde auf der Gingiva, zwei entzündliche Herde auf der Oberlippe, ein Herd auf der Zungenoberfläche und eine Papel auf der Lippenschleimhaut. Zwei Tage später kamen noch zwei neue Herde am oberen Lippensaum dazu. Diese klinischen Erscheinungen sind für die Stomatitis Papulosa charakteristisch (55), sie waren insgesamt vier Tage lang zu beobachten, bis eine "restitutio ad integrum" eintrat.

Berücksichtigt man erstens die Tatsache, daß gesunde Kälber experimentell auch mit hochtitrigem Stomatitis Papulosa-Zellkulturvirus schlecht zu infizieren sind, und zweitens, daß eine vorausgehende immunsuppressive Therapie eine postvaccinale Immunitätsbildung einschränkt oder verhindert, muß der Infektionsbelastungsversuch (Challenge) als sinnvoller Wirksamkeitstest der ORF-Vaccine ausgeschlossen werden. Da auch die natürliche Parapox-Virusinfektion der Rinder in der Praxis fast ausschließlich klinisch inapparent verläuft, bietet sich, wie die Versuche gezeigt haben, als beste Möglichkeit zur Überprüfung der Wirksamkeit einer Schutzimpfung von Rindern gegen die Stomatitis Papulosa mit heterologer ORF-Vaccine der Intracutantest an.

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Über Einzelfälle, wie auch über ein seuchenhaftes Auftreten der Stomatitis Papulosa bovis liegen zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten vor (2, 37, 39, 71). Es muß damit gerechnet werden, daß die Infektion weitverbreitet ist, in der Regel aber fast durchwegs bei gesunden Tieren klinisch inapparent verläuft und daher von Tierhaltern und Tierärzten nicht bemerkt wird. Erst die moderne Massentierhaltung und hier besonders die Kälber- und Bullenmast mit ihren zahlreichen Streßgegebenheiten wie "Crowding", Milieuwechsel, Futterumstellung, frühes Absetzen der Kälber, schlechtes Stallklima und anderes mehr, hat die Aufmerksamkeit wieder auf die Stomatitis Papulosa gelenkt, weil sie in letzter Zeit besonders gehäuft in Kälbermastbetrieben auftrat (67). Hierzu beigetragen hat auch der Zoonosecharakter der Infektion. Das Stomatitis Papulosa-Virus wird auf Personen, die engen Kontakt zu infizierten Tieren haben, übertragen und führt dort zu dem Bild des "Melkerknotens" (56, 57, 67). In der Regel verläuft die Infektion beim Rind klinisch inapparent. Kommt es zu Krankheiten, sind sie in der Regel örtlich lokalisiert ohne Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens und ohne Störung der Futteraufnahme. Sie äußern sich als Haut- und Schleimhautläsionen des Flotzmauls, der Zunge und Mundhöhle, selten des Oesophagus oder der Vormägen (56). Gelegentlich tritt auch eine Papelbildung mit typischem Ringzonenphänomen auf (Kokardenbildung) (60).
Eine Virulenzsteigerung des Erregers in abwehrgeschwächten Kälbern und Rindern kann zu einem Wandel der pathogenetischen Ereigniskette mit Übergang der Lokalkrankheit zu einer zyklisch verlaufenden Virusallgemeinkrankheit führen, wie wir dies derzeit auch bei Ecthyma der Schafe erleben (95). In diesen Fällen ist die Differentialdiagnose oftmals schwierig. Besonders die Abgrenzung zur Mucosal-Virus-Diarrhoe und gelegentlich auch zur IBR-IPV-Infektion bereitet dann Schwierigkeiten.

Mit dem gut immunisierenden, attenuierten ORF-Virusstamm D 1701 (108) bietet sich eine Lebendvaccine an, mit der auf der Basis der engen, immunologischen Verwandtschaft beider Virusarten eine heterologe Impfung gegen die Stomatitis Papulosa bovis möglich ist.

Die gute Verträglichkeit nach subcutaner Applikation hat sich, wie schon bei der homologen Immunisierung von Schafen(108), auch bei den Rindern erwiesen. Die fehlende Ausscheidung des heterologen Impfvirus ist ein zusätzlicher Sicherheitsfaktor. Da das Impfvirus auch für Schafe avirulent ist und sich beim Schaf schon über mehrere Jahre als Schutzimpfung gegen Ecthyma bewährt hat, besteht auch keine Gesundheitsgefährdung für die in der Umgebung von schutzgeimpften Rindern lebenden Schafe. Was die Wirksamkeit betrifft, so muß zunächst davon ausgegangen werden, daß hetereologe Impfstoffe eine geringgradige verminderte Immunitätsbildung induzieren. (vergleiche Kapitel 2.2.). Hinzu kommt speziell bei allen Parapocken-Krankheiten, daß die Immunität auch nach natürlichen Infektionen in der Regel schwach und nur von kurzer Dauer ist. Die Grundlage bilden zelluläre Immunreaktionen, während die Antikörperbildung ohne große Bedeutung ist, nur unregelmäßig und sehr schwach erfolgt (54, 55, 82, 86).

Die Schutzimpfung von Rindern mit dem heterologen ORF-Impfstoff stimulisierte die Antikörperbildung entsprechend nur sehr geringgradig. Nach Primovaccination ließen sich keine und nach Revaccination nur vereinzelt Antikörper nachweisen. Diese Befunde stimmen mit Untersuchungen bei natürlich infizierten Tieren gut überein (2,37). Der Enzymimmuntest "ELISA" wird als sehr empfindliche serologische Methode beschrieben (3, 10). Die niederen ELISA-Titer der wenigen positiven Boosterseren bestätigen die geringe Antikörperbildung (IgG) nach Infektionen

mit ORF- bzw. Stomatitis Papulosa-Virus bei Rindern. Die relativ hohen Extinktionswerte der vor der Immunisierung gewonnenen Seren können einmal als Folge einer unterschwelligen Antikörperbildung bei einer latenten Infektion, zum anderen auch als unspezifische Bindung an die Immunolonplatten, begünstigt durch die Verwendung einer verhältnismäßig niederen Konjugatverdünnung gewertet werden. Im Vergleich zum ELISA mit Seren vom Schaf nach homologer ORF-Immunisierung, wo ein Unterschied der Extinktionswerte zwischen Nullseren und Immunseren von 1,0 und darüber erzielt wird, liegt dieser Wert bei den Rinderseren meist an der Signifikanzgrenze (o,2 - 0,3). Eine so geringe Unterschiedsschwelle dürfte ebenfalls auf die schwache Beteiligung der humoralen Immunität gegen die Parapocken beim Rind, auch nach mehrfacher heterologer Impfung (K 8), zurückzuführen sein.

Um so auffälliger erscheint im Gegensatz dazu die starke und sehr spezifische Reaktion der Impflinge im Hauttest. Die heterologe Schutzimpfung des Rindes mit der ORF-Vaccine induzierte bei jedem Impfling eine starke zelluläre Immunität. Da die zelluläre Abwehrreaktion die Basis für eine Immunität gegen eine Stomatitis Papulosa-Infektion des Rindes darstellt, besitzt die ORF-Vaccination des Rindes eine gute Wirksamkeit. Dabei ist die durch die künstliche Immunisierung erzeugte Schutzwirkung möglicherweise stärker als eine vom Verlauf inapparenter Infektionen natürlich erworbene Immunität. Der subcutane Impfstimulus aktiviert die zellulären Abwehrmechanismen besonders stark, wobei neben erregerspezifischen sicher auch erregerunspezifische Vorgänge, wie zum Beispiel erhöhte Makrophagentätigkeit, Interferonbildung und anderes mehr, von Bedeutung sind.

Alle nach den Kriterien der Tuberkulinreaktion (16) getesteten Impflinge reagierten bis zu einer Antigenverdünnung von 1 : 10 homolog gegen ORF-Virus D 1701 und auch im Kreuztest gegen Stomatitis Papulosa-Virus V 660 stark positiv. Bei drei Tieren war sogar noch in einer Verdünnung von 1 : 100 eine positive Hautreaktion gegen das Impfvirus und in einem Fall auch gegen Stomatitis Papulosa-Virus nachweisbar. Die Spezifität des "Intracutan-Testes" ließ sich durch zahlreiche Kontrollen absichern. Nicht mit Parapockenviren-verwandte Virusspezies der Familie Poxviridae sowie andere Virusarten reagierten ebenso wenig wie Kulturmedien und Zellkulturextrakte.

Eine erfolgreiche experimentelle Infektion von Kälbern mit Stomatitis Papulosa-Zellkulturvirus wird von Liebermann als schwierig und gelegentlich nur mit hochtitrigem Virus ($10^{5,8}$/0,2 ml) als möglich bezeichnet (55). Der mißlungene Infektionsversuch bei dem gesunden Kalb (K 3) ist deshalb nicht ungewöhnlich. Umso interessanter ist es, daß nach immunsuppressiver Therapie die Infektion - klinisch einwandfrei diagnostizierbar - anging. Hiermit wird die Behauptung, eine klinisch apparente Stomatitis Papulosa-Infektion trete hauptsächlich in der Folge anderer, abwehrschwächender Noxen auf, bekräftigt.

Der erprobte heterologe ORF-Lebendimpfstoff kann technisch leicht hergestellt werden (Zellkulturimpfstoff auf BEL-Zellen) und wirkt nicht allein als Immunprophylaxe gegen die Erkrankung des Rindes an Stomatitis Papulosa bovis. Der Einsatz des heterologen Impfstoffes kann risikolos sowohl das Haften und eine Virulenzsteigerung des homologen Erregers durch gezielte Abwehrstimulation im Impfling verhindern, als auch bei konsequenter langdauernder Anwendung eventuell den homologen Erreger aus der Rinderpopulation verdrängen, und ferner seine Übertragung vom Tier auf den Menschen (Zoonose) eindämmen.

Da im Rahmen von Mischinfektionen besonders bei der Intensivhaltung und bei hohen Leistungsanforderungen stets auch Interaktionen mit in der Regel nur klinisch inapparent verlaufenden Infektionen speziell unter immunsuppressiven Streßbedingungen auftreten können (70), ist eine Schutzimpfung des Rindes gegen die Stomatitis Papulosa-Infektion, ganz abgesehen davon, daß es sich um eine Zoonose handelt, sinnvoll und sollte weiter erprobt werden. Dabei muß auch paraspezifischen Effekten, die bei Pockenschutzimpfungen besonders häufig auftreten und erregerunspezifisch andere Infektionen hemmen können, vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die seit langer Zeit bekannte, aber unbeachtet gebliebene (weil in der Regel klinisch inapparente) Infektion der Rinder durch das Stomatitis Papulosa-Virus gewinnt mit dem Wandel der Tierhaltungsformen (Crowding), vorallem bei der Kälber- und Bullenmast, zunehmend klinisches Interesse. Es bietet sich daher an, diese Infektionskrankheit der Rinder durch eine Schutzimpfung prophylaktisch zu bekämpfen.
Aus epidemiologischen, pathogenetischen und immunologischen Gründen wurde die Schutzimpfung der Kälber und Rinder mit einem heterologen Zellkultur-Lebendimpfstoff auf der Basis eines attenuierten ORF-Virus erstmals experimentell untersucht.

Der ORF-Impfstoff war nach subcutaner Applikation unschädlich, das Impfvirus wurde nicht ausgeschieden.

Die Schutzimpfung führte beim Rind zu einer starken zellulären Immunreaktion, die für Parapocken-Krankheiten die Grundlage der Abwehr bildet. Die zelluläre Immunantwort war spezifisch und gegenüber Stomatitis Papulosa-Virus wie gegenüber ORF-Virus fast gleichstark ausgebildet (Kreuzreaktion).

Humorale Reaktionen (IgG-Antikörperbildung) verliefen auch nach zweimaligem Impfstimulus (Booster) schwach. Die Anwesenheit humoraler Antikörper wurde im Neutralisationstest sowie mit der ELISA-Technik kontrolliert. Nach Primovaccination ließen sich keine Antikörper nachweisen, nach Revaccination kam es bei wenigen Tieren zu einer Antikörperbildung.

Mit der heterologen Schutzimpfung der Rinder gegen die Stomatitis Papulosa-Infektion auf der Basis des attenuierten, unschädlichen ORF-Virus-Stammes D 1701 wird nicht nur die Gesundheit der Tiere überwacht, sondern gleich-

zeitig ein Beitrag zum Schutz der Gesundheit des Menschen (Zoonoseerreger) geleistet.

Im Literaturteil werden die Grundlagen heterologer Schutzimpfungen, ihre Vor- und Nachteile, eingehend besprochen.

Heterologous vaccination against bovine papular stomatitis with an ORF live vaccine.

SUMMARY

Bovine papular stomatitits, a clinically inapparent virus disease infecting cattle, has been known for a long time. Due to the methods now being used in animal breeding, especially in fattening calves and bulls, this virus has become clinically important. For this reason, prophylatic vaccination of calves and cattle against this disease is of current interest.

For epidemiological, pathogenetic and immunological reasons, the vaccination of calves and cattle with a heterologous vaccine produced in cell cultures based on attenuated ORF virus has been investigated experimentally for the first time.

The ORF vaccine proved to be safe after subcutaneous application, the vaccine virus was not excreted.

Following vaccination, a strong cellular immune reaction in cattle was observed, which is the basis for protection against parapox diseases. The immune response was specific giving almost equally strong protection against both bovine papular stomatitis and ORF viruses.

The humoral reaction to the vaccine remained weak. No antibodies were detected following primo-vaccination. Following re-vaccination, antibody development was found in a few animals. The presence of antibodies was detected by means of the neutralization test and the ELISA technique.

The vaccination of cattle against bovine papular stomatitis infection with a heterologous attenuated ORF virus vaccine is not only effective as health protection for animals but also prevents the spread of infection to humans.

In the literature section the principles of heterologus vaccination as well as its advantages and disadvantages are discussed in detail.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AKERMANN, O. (1980): Early immunization against canine distemper and hepatitis, using combined vaccines.
   J. Am. Vet. Med. Ass. 156, 1755

2. AQUILAR-SETIÉN, A., CORREA-GIRÓN, P., HERNANDEZ-BAUMGARTEN, E., CRUZ-JOMES, A., HERNANDEZ-JAUREGNI, P. (1980): Bovine papular stomatitis, first report of the disease in Mexico.
   Cornell Vet. 70, 10

3. BACHMANN, P.A. (1979): Rotavirusnachweis in Faezes: Erfahrungen mit dem Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).
   Zbl. Vet. Med. B, 26, 835

4. BACHMANN, P.A. (1980): Stellungnahme zum Problem "Hundeseuche".
   Dtsch. Tierärzteblatt 3

5. BACHMANN, P.A. (1980): Ist eine kombinierte Prophylaxe beim neugeborenen Kalb gegen Darminfektionen mit E. coli und Rotaviren möglich?
   Prakt. Tierarzt 61, Heft 9, 718

6. BACHMANN, P.A. (1980): Infektionsrisiken für das Neugeborene.
   Fortschr. Vet. Med. 30, 61

7. BAKER, J.A. (April 1964): Heterotypic vaccines: a new concept for prevention of virus diseases in dogs.
   12th Meeting of the I.V.C.

8. BAMBERGER, K. und G. SZYKMARY (1961): Laboratory testing and field application of turkey pox vaccine.
   Magy. allatorv. Lapja 16, 289

9. BESTETTI, G., HÄNI, H., DUNAU, F., MEISTER, V., WABER, S. und H. LUGINBÜHL (1979): Panleukopenieähnliche Enteritis und plötzliche Todesfälle bei Welpen infolge Myokarditis, wahrscheinlich verursacht durch Parvoviren.
   Schweiz. Arch. Tierheilk. 121, 663

10. BIDWELL, D.E., ANN BARTLETT and A. VOLLER (1977): Enzyme immunoassays for viral diseases.
    J. infect. Dis. 136, 274

11. BRADBURNE, A.F. (1970): Antigenic relationships amongst coronaviruses.
Arch. ges. Virusforsch. 31, 352

12. BROWN, A.L., VITAMVAS, J.A., MERRY, D.L. jr., BECKENHAUER, W.H. (1972): Immune response of pups to modified live-virus canine distemper measles vaccine.
Am. J. Vet. Res., Vol. 33, No. 7, 1447

13. BROWN, F., TALBOT, P. and R. BURROWS (1973): Antigenic differences between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to coxsackie B 5 virus.
Nature 245, 315

14. BROWN, A.L. and R.E. McCarthy (1974): Relationship between measles and canine distemper viruses determined by delayed type hypersensitivity reactions in dogs.
Nature 248, 344

15. BÜTTNER, D., GIESE, H., MÜLLER, G.G. und D. PETERS (1964): Die Feinstruktur reifer Elementarkörper des Ecthmya contagiosum und der Stomatitis Papulosa.
Arch. ges. Virusforsch. 14, 657

16. Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1972, Teil I, Seite 927: "Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes".

17. BURTONBOY, G., COIGNOUL, F., DELFERRIERE, N. and P.P. PASTORET (1979): Canine hemorrhagic enteritis: detection of viral particles by electron microscopy.
Arch. Virol. 61, 1

18. CAMPBELL, J.J. COSBY, S.L., SCOTT, J.K., RIMA, B.K., MARTIN, S.J. and M. APPEL (1980): A comparison of measles and canine distemper virus polypeptides.
J. gen. Virol. 48, 149

19. CALMETTE, A. und GUÉRIN, C. (1908): Nouvelle contribution a l'etude de la vaccination des bovides contre la tuberculose.
Ann. Inst. Pasteur 22, 689

20. CALMETTE, A., GUÉRIN, C. und WEILL-HALLEE, B.(1924): Essais d'immunisation contre l'infection tuberculeuse.
Bull. Acad. med., Paris 91, 787

21. CLEMENTS, J.D. and R.A. FINKELSTEIN (1978): Immunological cross-reactivity between a heat-labile enterotoxin(s) of Escherichia coli and subunits of Vibrio cholerae enterotoxin. Inf. Imm. 21, 1036

22. CRUMRINE, M.H., FISCHER, G.W. and M.W. BALK (1979): Immunochemical cross-reactions between Type III Group B Streptococcus and Type 14 Streptococcus pneumoniae. Inf. Imm. 25, 960

23. DIECKERHOFF, W. (1903): Lehrbuch der speziellen Pathologie und Therapie für Tierärzte. 2. Bd. A. Hirschwald, Berlin 1903, 2 - 12

24. DOBRESCU, L. and HUYGELEN, C. (1976): Protection of piglets against neonatal E. coli enteritis by immunization of sows with a vaccine containing heat-labile enterotoxin (LT). Zbl. Vet. Med. B, 23, 79

25. VAN DRIMMELEN, G.S. and F.D. HORWELL (1961): Preliminary findings with the use of Brucella melitensis Strain Rev. 1 as a vaccine against Brucellosis in cattle. Bull. Off. int. Epiz. 62, 987

26. DUDLEY, J.M., NIXON, A. and A.M. MUMFORD (1978): Distemper and measles vaccines - a comparative trial. J. small Anim. Pract. 19, 463

27. ENGVALL, E. and P. PERLMANN (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8, 871

28. FENG, W.C. and J.L. WANER (1980): Serological cross-reaction and cross-protection in guinea pigs infected with Rickettsia rickettsii and Rickettsia montona. Inf. Imm. 28, 627

29. FENNER, F. and F.N. RATCLIFFE (1965): Myxomatosis. Cambridge Univ. Press., London-New York

30. FISCHER, G.W., LOWELL, G.H. CRUMRINE, M.H. and BASS, J.W. (1978): Demonstration of opsonic activity and in vivo protection against Group B Streptococci Type III by Streptococcus pneumoniae Type 14 antisera. J. exp. Med. 148, 776

31. GAGNON, A.N. and R.C. POVEY (1979): A possible parvovirus associated with an epidemic gastroenteritis of dogs in Canada.
Vet. Rec. 104, 263

32. GARCIA-CARRILLO, C. (1980): Comparison of B. melitensis Rev. 1 and B. abortus strain 19 as a vaccine against Brucellosis in cattle.
Zbl. Vet. Med. B, 27, 131

33. GEHRING, H., MAHNEL, H. und H. MAYER (1972): Elefantenpocken.
Zbl. Vet. Med. B, 19, 258

34. GERBER, J.D. and A.E. MARRON (1976): Cell mediated immunity and age at vaccination associoted with measles inoculation and protection of dogs against canine distemper.
Am. J. Vet. Res. 37, 133

35. GIBBS, E.P.J., TAYLOR, W.P., LAWMAN, M.J.P. and J. BRYANT (1979): Classification of peste des petits ruminants as the fourth member of the genus Morbillivirus.
Intervirology 11, 268

36. GRAVES, J.H. (1973): Serological relationship of swine vesicular disease virus and coxsackie B 5 virus.
Nature 245, 314

37. GRIESEMER, R.A. and C.R. COLE (1960): Bovine papular stomatitis.
J. Am. Vet. Med. Ass. 137, 404

38. VAN HERDEN, K.M. (1964): Results obtained by the use of Rev. 1 vaccine in sheep against infectious infertility suspected to be caused by ovine brucellosis.
Bull. Off. int. Epiz. 62, 52

39. HESSAMI, M., KENEY, D.A., PEARSON, L.D. and J. STORZ (1979): Isolation of parapox viruses from man and animals: cultivation and cellular changes in bovine fetal spleen cells.
Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 2, 1

40. HO, C.K. and L.A. BABIUK (1979): Mechanisms of heterotypic immunity against canine distemper.
Experientia 35, 1179

41. HOLMGREN, J. and A.-M. SVENNERHOLM (1979): Immunological cross-reactivity between Escherichia coli heat-labile enterotoxin and Cholera toxin A and B subunits.
Current Microbiol. 2, 55

42. HOPKINS, C.A., GOODALL, R.I. and A. ZAJAC (1977): The longevity of Hymenolepis microstoma in mice, and ist immunological cross-reaction with Hymenolepis diminuta.
Parasitology 74, 175

43. HORZINEK, M.C. and A.D.M.E. OSTERHAUS (1979): Feline infectious peritonitis: A worldwide serosurvey.
Am. J. Vet. Res. 40, 1487

44. IMAGAWA, D.T. (1968): Relationships among measles, canine distemper and rinderpest viruses.
Prog. med. Virol., Vol. 10, Verlag Karger Basel, 160

45. KAYE, H.S., YARBROUGH, W.B., REED, C.J. and A.K. HARRISON (1977): Antigenic relationship between human coronavirus strain OC 43 and haem-agglutinating encephalomyelitis virus strain 67 N of swine: Antibody responses in human and animal sera.
J. infec. Dis. 135, 201

46. KELLY, W.R. (1978): An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia.
Aus. Vet. J. 54, 593

47. KEPPIE, J., WITT, J. and H. SMITH (1962): Cross immunisation with products of Br. abortus, melitensis and suis.
Brit. J. exp. Path. 44, 84

48. KLIPSTEIN, F.A. and R.F. ENGERT (1977): Immunological interrelationships between Cholera toxin and the heat-labile and heat-stable enterotoxins of coliform bacteria.
Inf. Imm. 18, 110

49. KLIPSTEIN, F.A. and R.F. ENGERT (1978): Immunological relationship of different preparations of coliform enterotoxins.
Inf. Imm. 21, 771

50. KNOX, S. and M. SHIFRINE (1980): Cell-mediated immunity in the dog in relation to disease: A review.
Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis., Vol. 2, 405

51. KRAAIJEVELD, C.A.,MADGE, M.H. and M.R. MACNAUGHTON (1980): Enzyme-linked immunosorbent assay for coronaviruses HCV 229 E and MHV 3.
J. gen. Virol. 49, 83

52. KRAKOWKA, S. and A.L. WALLACE (1979): Lymphocyte-associated immune response to canine distemper and measles viruses in distemper-infected gnotobiotic dogs.
Am. J. Vet. Res. 40, 669

53. LAI, S.S., McKERCHER, P.D. and D.M. MOORE (1980): Response of pigs to recent isolates of coxsackie-virus B 5.
Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis. 2, 459

54. LIEBERMANN, H. (1967): Vergleichende immunhistologische Studien an mit Paravakzine infizierten Zellkulturen.
Arch. exp. Vet. Med. 21, 1379

55. LIEBERMANN, H. (1967): Das Infektionsspektrum des Virus der Stomatitis Papulosa.
Arch. exp. Vet. Med. 21, 1337

56. LIEBERMANN, H. (1967): Untersuchungen über die Stomatitis Papulosa unter Berücksichtigung der Differentialdiagnose.
Arch. exp. Vet. Med. 21, 1319

57. LIEBERMANN, H. (1967): Die verwandtschaftlichen Beziehungen der Stomatitis Papulosa zu anderen Erkrankungen bei Mensch und Tier.
Arch. exp. Vet. Med. 21, 1391

58. MACNAUGHTON, M.R. (1980): The polypeptides of human and mouse coronaviruses.
Arch. Virol. 63, 75

59. MAYR, A. (1959): Geflügelpockenimpfstoffe aus T- und H-Stämmen.
Mh. f. Thkd. 11, 339

60. MAYR, A. (1964): Beziehungen zwischen Ringzonenphänomen und Interferon.
Zbl. Bakt. I. Orig. 195, 227

61. MAYR, A. und K. MALICKI (1966): Attenuierung von virulentem Hühnerpockenvirus in Zellkulturen und Eigenschaften des attenuierten Virus.
Zbl. Vet. Med. 13, 1

62. MAYR, A., MAHNEL, H. und E. MUNZ (1972): Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren.
Zbl. Vet. Med. B, 19, 69

63. MAYR, A. (1976): TC-Marker des attenuierten Vaccinia-Impfstammes "MVA" in menschlichen Zellkulturen, zugleich ein Beitrag zur Schutzimpfung gegen Orthopoxerkrankungen beim Tier.
Zbl. Vet. Med. B, 23, 417

64. MAYR, A., STICKL, H., MÜLLER, H.K., DANNER, K. und H. SINGER (1978): Der Pockenimpfstoff MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abgeschwächten Organismus.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B, 167, 375

65. MAYR et al. (1978): Virologische Arbeitsmethoden I/II.
Fischer Verlag

66. MAYR, A. und K. DANNER (1979): Bedeutung von Tierpocken für den Menschen nach Aufhebung der Pflichtimpfung gegen Pocken.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 251

67. MAYR, A. (1979): Control of acute Virus Diseases of calves in the Federal Republic of Germany.
Veterinary Science Communications 3, 3

68. MAYR, A., RAETTIG, H., STICKL, H. und META ALEXANDER (1979): Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer.
Fortschr. Med., 97. Jahrg., Nr. 25 - 26, 1159

69. MAYR, A. (1979): Erfahrungen mit dem Paramunitätsinducer PIND-AVI in der Tiermedizin.
Prakt. Tierarzt 60, 35

70. MAYR, A. und W. KÖHLER (1980): Mischinfektionen.
Gustav Fischer Verlag Jena, 1. Auflage

71. MORENO-LÓPEZ, J. and J. LIF (1979): A parapoxvirus isolated from nasal secretion of a calf with respiratory disease.
Vet. Microbiol. 4, 85

72. MUNZ, E. (1966): Die Lumpy skin disease des Rindes.
Vet. Med. Habil. Schrift München

73. MUSOKE, A.J. and J.F. WILLIAMS (1976): Immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis: protective antibody response to implanted parasites.
Int. J. Parasitol. 6, 265

74. NAGY, L.K., WALKER, P.D., BHOGAL, B.S. and T. MACKENZIE (1978): Evaluation of E. coli vaccines against experimental enteric colibacillosis. Res. Vet. Sci. 24, 39

75. NALIN, D.R., AL-MAHMUD, A., CURLIN, G., AHMED, A. and J. PETERSON /1974): Cholera toxoid boosts serum Escherichia coli antitoxin in humans. Inf. Imm. 10, 747

76. ÖRVELL, C. and E. NORRBY (1974): Further studies on the immunologic relationships among measles, distemper and rinderpest viruses. J. Immunol. 113, 1850

77. OSTERHAUS, A.D.M.E., VAN STEENIS, G. and P. DE KREEK (1980): Isolation of a virus closely related to feline panleukopenia virus from dogs with diarrhea. Zbl. Vet. Med. B, 27, 11

78. PECK, R.D., BROWN, A. and WUST, C.J. (1975): Preliminary evidence for cell-mediated immunity in cross-protection among group A arboviruses. J. Immunol. 114, 581

79. PEDERSEN, N.C., WARD, J. and W.L. MENGELING (1978): Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to Coronaviruses of other species. Arch. Virol. 58, 45

80. PESTI, L. (1979): Escherichia coli infection in piglets. Fortschr. Vet. Med. Heft 29, 33

81. PIERCE, N.F. (1977): Protection against challenge with Escherichia coli heat-labile enterotoxin by immunization of rats with cholera toxin/toxoid. Inf. Imm. 18, 338

82. PLOWRIGHT, W. and R.D. FERRIS (1959): Papular stomatitis of cattle. II.-Reproduction of the disease with culture-passaged virus. Vet. Rec. 71, 828

83. PRYDIE, J. (1970): The immunologic concept of heterotypic resistance. J.A.V.M.A., Vol. 156, Nr. 12, 1747

84. PURCHASE, H.G. (1972): Recent advances in the knowledge of Marek's disease. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 16, 223

85. RITCHIE, J.M., HANDSON, J.R. and H.V. THOMPSON (1954): Myxomatosis.
Vet. Rec. 66, 796

86. ROLLE, M. und A. MAYR (1978): Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

87. SCHMIDT, U., LIEBERMANN, H., WERNER, O. und H. PRAUSE (1980): Immunprophylaxe gegen Mareksche Krankheit und ihre Perspektive.
Arch. exper. Vet. med. 34, 149

88. SCHRÖTER, W., STICKL, H., IDEL, H. und H.-W. SCHLIPKÖTER (1980): MVA-Stufenimpfung bei Pockenschutz-Erstimpfungen nach dem dritten Lebensjahr.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 171, 309

89. SINGH, J.P. PANDEY, R. and R.N. SRIVASTAVA (1979): Sheep pox: a review.
The Veterinary Bulletin 49, 145

90. SOJKA, W.J. MORRIS, J.A. and C. WRAY (1979): Enteric colibacillosis in lambs with special reference to passive protection of lambs against experimental infection by collostral transfer antibodies from ewes vaccinated with K 99.
Fortschr. Vet. Med., Heft 29, 52

91. STICKL, H., v. HOCHSTEIN-MINTZEL, MAYR, A., HUBER, H.CH., SCHÄFER H. und A. HOLZNER (1974): MVA-Stufenimpfung gegen Pocken.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2386

92. STICKL, H. und A. MAYR (1979): Über die Wirksamkeit eines neuen Paramunitätsinducers (PIND-AVI) für Mensch und Tier.
Fortschr. Med. 97, 40

93. TAYLOR, W.P. (1979): Protection of goats against peste-des-petits-ruminants with attenuated rinderpest virus.
Res. Vet. Sci. 27, 321

94. TRÜDINGER, C. (1977): Untersuchungen über eine heterospezifische Immunisierung zwischen Clostridium tetani und Clostridium novyi.
Vet. Med. Diss. München

95. VALDER, W.-A., STRAUB, O.G., THIEL, W., WACHENDÖRFER, G. und K. ZETTL (1979): Ecthyma contagiosum des Schafes - Wandel des klinischen Bildes.
Tierärztl. Umschau 34, 828

96. VIELITZ, E. und H. LANDGRAF (1971): Impfversuche gegen Marek'sche Krankheit unter Verwendung von attenuiertem Marek-Herpes-Virus und Puten-Herpes-Virus.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 78, 617

97. VOGT, D. (1965): Die Tuberkuloseschutzimpfung.
Aus: A. Herrlich, Handbuch der Schutzimpfungen, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

98. VAN WEEMANN, B.K. and A.H.W.M. SCHUURS (1971): Immunoassay using antigen enzyme conjugates.
FEBS Letters 15, 232

99. WHO-Memorandum (1976): Immunologie de la Schistosomiase - immunité hétérologue.
Bull. WHO, Vol. 54, 3487

100. WILLIAMS, J.F. (1979): Recent advances in the immunology of cestode infections.
J. Parasitol. 65, 337

101. WITTE, K.H., TUCH, K., DUBENKROPP, H. und C. WALTHER (1977): Untersuchungen über die Antigenverwandtschaft der Viren der felinen infektiösen Peritonitis (FIP) und der transmissiblen Gastroenteritis (TGE) des Schweines.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90, 396

102. WITTEK, R., HERLYN, H., SCHÜMPERLI, D., BACHMANN, P.A., MAYR, A. and R. WYLER (1980): Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains.
Intervirology 13, 33

103. WOODE, G.N. BEW, M.E. and M.J. DENNIS (1978): Studies on cross protection induced in calves by rotaviruses of calves, children and foals.
Vet. Rec. 103, 32

104. WOODS, R.D. and PEDERSEN, N.C. (1979): Cross-protection studies between feline infectious peritonitis and porcine transmissible gastroenteritis viruses.
Vet. Microbiol. 4, 11

105. WYATT, R.G., YOLKEN, R.H., KALICA, A.R., JAMES, H.D. jr., KAPIKIAN, A.Z. and CHANOCK, R.M. (1979): Rotaviral immunity in gnotobiotic calves: heterologous resistance to human virus induced by bovine virus.
Science 203, 548

106. YETTER, R.A., BARBER, W.H. and P.A. SMALL jr. (1980): Heterotypic immunity to influenza in ferrets.
Infect. Immun. 29, 650

107. YETTER, R.A., LEHRER, S., RAMPHAL, R. and P.A. SMALL jr. (1980): Outcome of influenza infection: effect of site of initial infection and heterotypic immunity.
Infect. Immun. 29, 654

108. ZACH, A. (1979): Untersuchungen über Wirksamkeit und Unschädlichkeit eines neuen Zellkulturimpfstoffes gegen die Pustulardermatitis der Schafe (Ecthyma, ORF).
Vet. Med. Diss. München

Herrn Professor Dr. DDr.h.c. Anton Mayr
danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine hilfreiche Unterstützung.

LEBENSLAUF

Name:	Mathias, Friedrich Büttner
Geburtstag und -ort:	2.8.1952, Mittenwald, Kreis Garmisch-Partenkirchen
Eltern:	Friedrich Büttner und Ehefrau Ernestine, geborene Haselbacher
Beruf des Vaters:	Zollamtmann
Ausbildung:	5 Jahre Volksschule in München von 1958 - 1963
	9 Jahre Gymnasium in München von 1963 - 1972
	Juni 1972 Abitur
Wehrdienst:	Wegen 10jähriger Dienstverpflichtung beim BRK (Katastrophenschutz) - Befreiung vom Wehrdienst
Studium:	Ab WS 1972/73 Studium der Tiermedizin an der LMU München
	Ab WS 1977/78 Doppelstudium: Medizin / Tiermedizin
Juni 1978:	Staatsexamen Tiermedizin
August 1978:	Approbation als Tierarzt
Ab September 1978:	Promotionsstudium - Tiermedizin - am Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Vorstand: Prof. Dr. DDr.h.c. Anton Mayr